

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
(Direktor: Professor Dr. med. P. Schölmerich)

Enzymatische Bestimmung von
Uridindiphosphatglucuronsäure.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Alfred Schmitt

aus Lorsch

Mainz, den 15. 7. 1974

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
(Direktor: Professor Dr. med. P. Schölmerich)

Enzymatische Bestimmung von
Uridindiphosphatglucuronsäure.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Alfred Schmitt

aus Lorsch

Mainz, den 15. 7. 1974



Fachbereichsdekan: Professor Dr. med. J. Fischer

Referent: Professor Dr. med. C.-H. Hammar

Korreferent: Professor Dr. med. K. H. Bössler

Für die Überlassung der Arbeit danke ich Herrn Prof.
Dr. med. C.-H. Hammar, Oberarzt der II. Medizinischen
Klinik und Poliklinik der Universität Mainz.

Frau D. Müller, Dipl. Mathematiker am Institut für
Medizinische Statistik und Dokumentation der Univer-
sität Mainz, danke ich für ihre Hilfe bei der stati-
stischen Auswertung der Ergebnisse.

Für die technische Assistenz danke ich Frau C. Schmitt
und Frau B. Hemsath.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung

1. Einleitung

2. Einleitung

3. Einleitung

4. Einleitung

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

1. Einleitung

2. Einleitung

3. Einleitung

4. Einleitung

5. Einleitung

6. Einleitung

7. Einleitung

8. Einleitung

9. Einleitung

10. Einleitung

11. Einleitung

12. Einleitung

13. Einleitung

14. Einleitung

15. Einleitung

Einleitung

1. Einleitung

2. Einleitung

3. Einleitung

4. Einleitung

Einleitung

1. Einleitung

2. Einleitung

3. Einleitung

Einleitung

Einleitung

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Einleitung	
1. Glucuronidbildung	1
2. Glucuronyltransferase	4
3. Uridindiphosphatglucuronsäure	8
4. UDPGA-Bestimmung.	10
Material	15
Experimenteller Teil	16
1. Enzympräparation.	18
2. Einfluß von Aktivatoren	19
3. Enzym-Menge	24
4. Substrat-Konzentration	25
5. Puffer-System	27
6. Inkubationsbedingungen	30
7. Enteiweißung und MUBF-Extraktion.	32
8. Hydrolyse mit β -Glucuronidase	36
9. Fluoreszenzphotometrie	40
10. UDPGA-Bestimmung - Übersicht.	43
11. Aufbereitung von biologischem Material	45
12. Wiederfindung von UDPGA	55
13. Untersuchung menschlicher Proben.	58
14. Untersuchung tierischer Gewebe	60
15. Statistische Auswertung der Versuche.	65
Ergebnisse	
1. Charakterisierung der Methode	66
2. Untersuchung menschlicher Proben.	66
3. Untersuchung tierischer Gewebe	67
4. Korrelationen bei Meerschweinchen	68
Diskussion	
1. Zur Methodik der UDPGA-Bestimmung	80
2. Organanalysen	84
3. Korrelationen	89
Zusammenfassung	94
Literaturverzeichnis	95

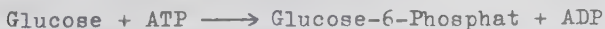
Einleitung

1. Glucuronidbildung:

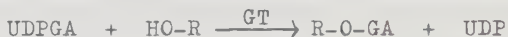
Zu den vielfältigen Aufgaben der Leber gehört die Inaktivierung und Eliminierung endogener Stoffe (Bilirubin, Steroidhormone, Thyroxin, Phenyllessigsäure) und exogener Substanzen (Bromthalein, Pharmaka, Gifte). Diese Partialfunktion der Leber, die zur Entstehung von zumeist unwirksamen und leicht ausscheidbaren Metaboliten führt, bezeichnet man allgemein als "Entgiftung" und unterstellt dem Organismus damit gewissermaßen eine Absicht (36), obwohl sehr viele körpereigene und körperfremde Substanzen auf diesem Wege verändert und ausgeschieden werden, unabhängig von der eigentlichen Toxizität. Weniger festlegend erscheint die Bezeichnung "Biotransformation" für diese Stoffwechselvorgänge.

Entsprechend der Vielzahl und Verschiedenheit der anfallenden Verbindungen, verfügt der Organismus über mehrere Möglichkeiten der Biotransformation. Prinzipielle Wege dieses Chemismus sind Reduktion, Oxydation, Methylierung Azetylierung und nicht zuletzt die Kopplung verschiedener wasserunlöslicher Substanzen und Stoffwechselprodukte an Glucuron- oder Schwefelsäure. Die Konjugation an Glucuronsäure ist dabei der bevorzugte Reaktionsablauf, vielleicht dadurch bedingt, daß der Organismus Glucuronsäure leicht aus Glucose oder Glycogen herstellen kann und diese mit einer großen Anzahl chemischer Konfigurationen reagieren kann (25).

Um Glucuronide (Glycoside der Glucuronsäure, gepaarte oder konjugierte Glucuronsäuren) bilden zu können, muß die Glucuronsäure jedoch erst in eine aktivierte Form überführt werden, in Uridindiphosphatglucuronsäure (UDPGA). Diese entsteht über folgende Reaktionen (10, 11, 15, 29, 43):



Die Übertragung des Glucuronylrestes von UDPGA auf das jeweilige Aglycon (HO-R, zuckerfreier Rest) wird durch das Enzym Glucuronyltransferase (GT) (Uridindiphosphat-glucuronate-glucuronyltransferase E.C.2.4.1.17) (17) katalysiert, und es bilden sich das entsprechende Glucuronid (R-O-GA) und Uridindiphosphat (UDP):



Wie das Schema deutlich macht, handelt es sich bei der Glucuronidierung um eine Transferase-Reaktion, bei der UDPGA Glucuronsäure(GA)-Donator ist.

Durch die Bindung an Glucuronsäure ändern die ursprünglichen Substanzen ihre physikochemischen Eigenschaften. Es entstehen starke Säuren (pK um 3,5), die bei physiologischem pH vollständig ionisiert und daher gut wasserlöslich sind (61). Ebenso begünstigend für die Elimination der Glucuronide ist ihre schlechte Lipoidlöslichkeit. Die als Anionen vorliegenden Verbindungen können die Lipoidbarrieren der Gewebe nur schlecht passieren, sie verteilen sich im Extrazellularraum. Gleichzeitig hemmt die Lipophobie der Glucuronide die ständige Rückdiffusion während der tubulären Passage, wodurch die renale Ausscheidung verstärkt wird (61).

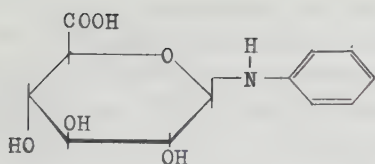
Neben diesen Mechanismen führt auch die durch die Konjugation veränderte molekulare Struktur der glucuronidierten Substanzen dazu, daß die Glucuronide eine starke Abnahme ihrer biologischen Wirkung gegenüber ihrem Aglycon zeigen. So kann sich der von UDPGA übertragene Glucuronylrest mit aktiven Zentren des Aglycons verbinden und diese blockieren.

Die Glucuronide unterscheiden sich durch die Art der Bindung zwischen Glucuronsäure und Aglycon. Es lassen sich vier verschiedene Gruppen unterteilen:

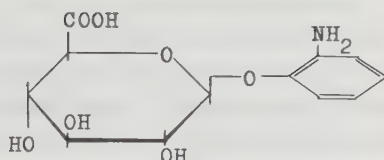
Glucuronidtyp:

Glucuronsäure gebunden über:

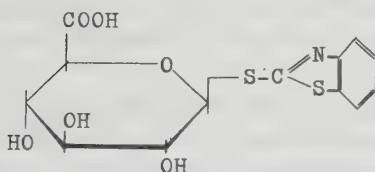
- | | |
|---------------------------|--|
| 1. Ätherglucuronide | phenol., enol. o. alkohol. Hydroxylgr. |
| 2. Esterglucuronide | aromat. oder aliphatic. Carboxylgr. |
| 3. Stickstoff- o. N-Gluc. | Amino- oder Iminogruppe |
| 4. Schwefel- o. S-Gluc. | Sulphydrylgruppe |



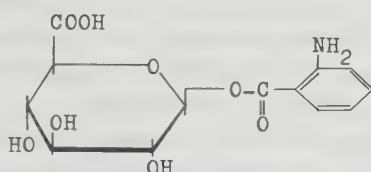
Stickstoff- bzw N-Glucuronid



Ätherglucuronid



Schwefelglucuronid



Esterglucuronid

Abb. 1: Die vier verschiedenen Bindungsarten zwischen Glucuronsäure und Aglycon.

Die in vitro-Synthese von Glucuroniden der verschiedenen Bindungstypen ist mit zahlreichen physiologischen und nicht-physiologischen Aglyconen möglich. Die gebräuchlichsten davon, die hauptsächlich als Substrate bei der Untersuchung der Glucuronidierungsleistung von Geweben (Glucuronyltransferase-Aktivität) verwendet werden, sind:

1. für die Synthese von Ätherglucuroniden:

- o-Aminophenol (8, 14, 16, 31, 42, 48, 49)
- p-Nitrophenol (31, 33, 35, 45, 53, 49)
- 4-Methylumbelliferon (1, 19, 49, 52, 65)
- Phenolphthalein (37, 42, 49, 63)

2. für die Synthese von Esterglucuroniden:

- o-Aminobenzoat (11)
- Anthranilsäure (66)
- Bilirubin (24, 39, 59, 68, 72)

3. für die Synthese von Stickstoffglucuroniden:

- Anilin (2, 3, 41)

2. Glucuronyltransferase:

Die verschiedenen Bindungstypen der Glucuronsäurekonjugate waren Anlaß vieler Arbeiten der letzten Jahre, sich mit dem Enzym der Glucuronidsynthese, der Glucuronyltransferase (GT), zu befassen, da eine Multiplizität des Enzyms bzw. das Vorliegen mehrerer verschiedener Glucuronyltransferasen angenommen werden mußte.

Die GT ist innerhalb der Zelle an die Strukturen des endoplasmatischen Retikulums gebunden, welches ein Bestandteil der heterogenen Mikrosomenfraktion darstellt. (105000·g Fraktion n. SCHNEIDER u. HOGEBOOM (60)).

Die Isolation und Reinigung der an unlösliche Partikel gebundenen GT ist wegen ihrer Unbeständigkeit in gelöstem Zustand bisher nur teilweise gelungen. Erstmals erhielt ISSELBACHER (35) durch Behandlung von Leberparenchym-Mikrosomen mit Trimesurus Flaviridis-Gift lösliche und angereicherte GT-Fraktionen.

HOWLAND u. Mitarb. (31) stellten 1971 ein teilweise gereinigtes, lösliches und stabiles Enzym-Präparat der GT her, indem sie Lebermikrosomen mit Lubrol, einem nicht-ionischen Detergens behandelten.

Eine Reihe von Befunden deuten an, daß es sich bei der GT um mehrere Enzyme handelt:

1. Einige Tierarten können bestimmte Substrate nicht koppeln (GUNN-Ratten konjugieren kein Bilirubin, Katzen bilden keine Ätherglucuronide)(2, 13).
2. Verschiedene Spezies zeigen eine getrennt verlaufende Entwicklung der GT-Aktivität gegenüber p-Nitrophenol und o-Aminophenol (31, 64).
3. Nicht alle Substrate der GT hemmen sich gegenseitig (11, 35, 39, 64).
4. In Lösung gebrachte GT-Fraktionen verlieren ihre Aktivität gegenüber bestimmten Substraten (35).
5. Nach Aktivierung bzw. Hemmung durch Magnesium- oder Calciumionen zeigt die GT unterschiedliche Aktivitäten gegenüber bestimmten Substraten (8, 66).
6. Unterschiedliche GT-Aktivitätsverteilung auf glatte und raue Membrane des endoplasmatischen Retikulums ist durch Fraktionierung von Mikrosomen nachweisbar (23).

HOWLAND (31) sieht in diesen Befunden nur einen unvollständigen und indirekten Beweis für die Existenz mehrerer UDP-Glucuronyltransferasen, da alle Autoren mit einfachen Homogenaten, Mikrosomensuspensionen oder nur teilweise gereinigten, instabilen Enzympräparaten gearbeitet haben. HOWLAND u. Mitarb. (31) kommen auf Grund eigener Versuche mit Lubrol-extrahierter GT jedoch auch zu dem Schluß, daß die beiden Substrate p-Nitrophenol und o-Aminophenol von verschiedenen Glucuronyltransferasen konjugiert werden.

Im Widerspruch zu dem Konzept einer Multiplizität der GT stehen zwei Arbeiten. FREZZA u. Mitarb. (20) konnten die Bildung von 4-MUBF-Glucuronid mit Bilirubin hemmen, wobei menschliches Leberhomogenat als Enzympräparat verwendet wurde. Die Autoren leiten davon ab, daß die Synthese von Äther- und Esterglucuroniden von demselben Enzym katalysiert wird.

Gewichtige Argumente gegen eine Heterogenität der GT sieht auch MULDER (49) in den Ergebnissen seiner Versuche mit aktivierten Enzympräparaten. Davon ausgehend, daß die Verwendung von nicht aktivierten Enzymaufbereitungen zu Beobachtungen bezüglich der Enzym-Substrat-Reaktionen führt, die als Effekte der durch das Homogenisieren bedingten "Latenz" der GT in vitro zu werten sind, arbeitet MULDER mit Enzympräparaten (20 %ige Leberhomogenate), die vorher durch Zusatz von Triton-X-100, einem Detergens, aktiviert wurden. Dadurch soll verhindert werden, daß Änderungen im Grad der "Latenz der GT" Einfluß nehmen auf die Beurteilung der Substratspezifität. MULDER (49) untersucht die Glucuronidierung von vier Substraten (p-Nitrophenol, Phenolphthalein, o-Aminophenol, 4-Methylumbelliferon) und ihre gegenseitige Hemmung und kommt zu dem Ergebnis, daß alle durch ein Enzym mit demselben aktiven Zentrum konjugiert werden. Eine endgültige Charakterisierung der GT ist wahrscheinlich erst dann möglich, wenn sich das Enzym (die Enzyme ?) isoliert und gereinigt darstellen läßt. Wertvoll wäre die Klärung der Multiplizität nicht nur für den Vergleich der GT-Aktivitäten bei unterschiedlichen Spezies oder bezüglich verschiedener Substrate, sondern sie würde vor allem helfen, die Ursachen der Hyperbilirubinämie bei Neugeborenen zu klären(31).

Den zahlreichen Arbeiten, die sich mit dem Problem der Glucuronidierung befassen, liegen zwei verschiedene Arten der Methodik zu Grunde.

In vivo-Untersuchungen, bei denen nach oraler oder i.v. Verabreichung geeigneter Substrate die Glucuronidausscheidung bestimmt wird, geben Aufschluß über größere Bereiche der Entgiftungsmechanismen des Körpers und haben als sog. "Leberfunktionsproben" klinische Bedeutung erlangt (4, 44, 51, 69).

Differenziertere Informationen über die Entgiftungskapazität bestimmter Organe als diese Globaltests bringen in vitro-Enzymbestimmungen. Diese sind von vielen Autoren unter verschiedensten Bedingungen durchgeführt worden. Der Versuch einer vergleichenden Zusammenstellung findet sich bei PERONA (52).

In allen Arbeiten nimmt die Glucuronyltransferase eine zentrale Stellung ein, obwohl die Glucuronidierung in gleicher Weise bestimmt wird von den einzelnen Gliedern im Gesamtablauf der Glucuronidsynthese, von ISSELBACHER (33) als UDP-Zyklus bezeichnet oder auch Glucuronsäurezyklus (21) (Abb. 2).

So ist z.B. die Menge der zur Verfügung stehenden Uridindiphosphatglucuronsäure (UDPGA) oder die Aktivität der UDP-Glucose-Dehydrogenase (30, 46), die UDP-Glucose zu UDPGA oxydiert, ebenso entscheidend für das Ausmaß der Glucuronidbildung wie die Aktivität der Glucuronyltransferase.

Daß das "Coenzym" UDPGA bei der Untersuchung der Glucuronidierungsvorgänge bisher nur am Rande Berücksichtigung fand, lag vielleicht auch daran, daß eine exakte Methode zur Bestimmung der UDPGA bislang nicht vorhanden war, lediglich abschätzende Messungen im Vergleich zu anderen Geweben waren möglich.

Dieser Mangel an einer optimierten Methode zur quantitativen Bestimmung der UDPGA in verschiedenen biologischen Materialien war Anlaß der hier mitgeteilten Untersuchungen.

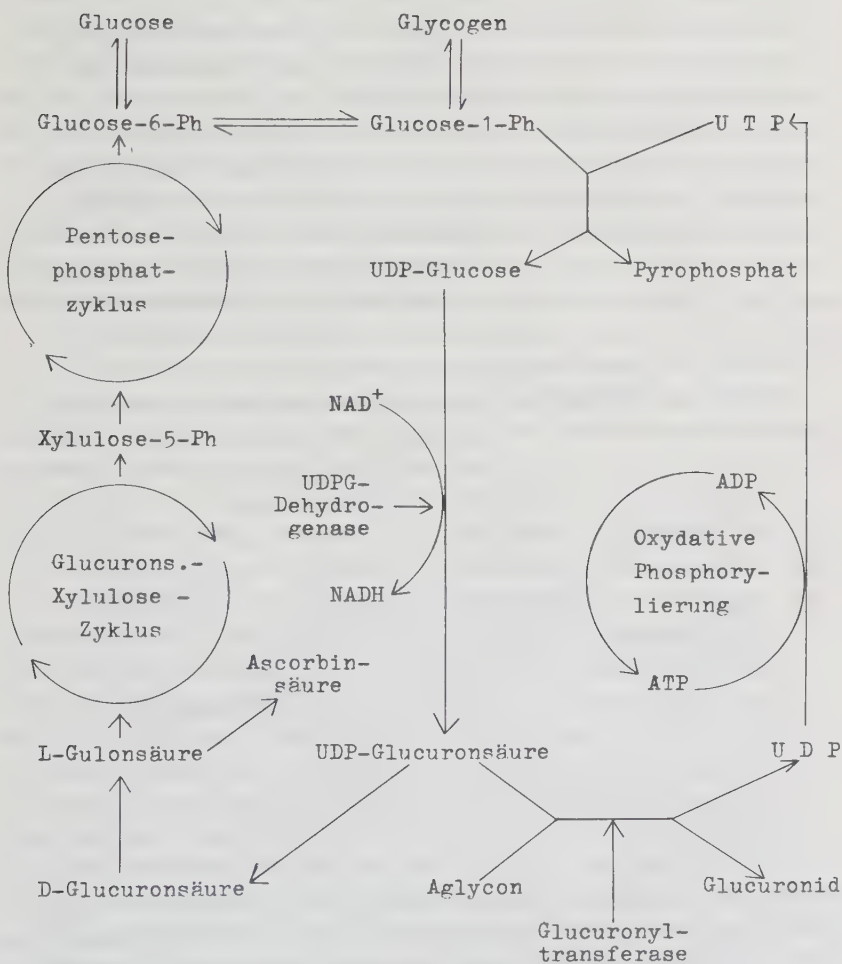


Abb. 2: Schema der Glucuronidsynthese mit UDP-Zyklus und die Beziehungen zum Kohlenhydratstoffwechsel.

3. Uridindiphosphatglucuronsäure:

Im Jahre 1953 beschrieb DUTTON (10) die Isolation einer Verbindung von Uridindiphosphat (UDP) und Glucuronsäure aus einem gekochten Hasenleberextrakt. Später beobachtete er zusammen mit STOREY (14), daß ein Zellhomogenat viel weniger Glucuronid synthetisierte, als intakte Zellen in Gewebsschnitten. Man führte dies zurück auf das Fehlen eines für die Glucuronidierung essentiellen Faktors im Homogenat. Ein solcher thermostabiler Faktor konnte durch Zugabe von Leberkochsaft zum Homogenat nachgewiesen werden, da sich nun die Glucuronidsynthese in einem der Aktivität intakter Zellen vergleichbarem Ausmaß steigerte.

DUTTON und STOREY (15) konnten den aktiven Faktor isolieren und als Uridindiphosphatglucuronsäure identifizieren.

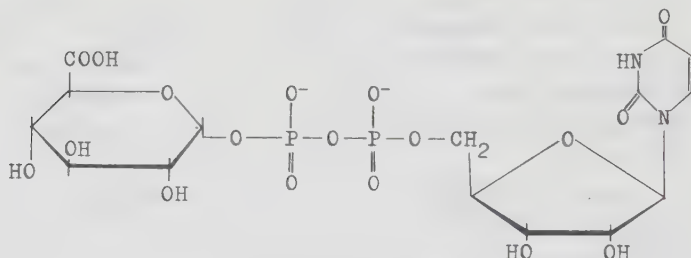


Abb. 3: Struktur der "aktivierten Glucuronsäure".

Dabei handelt es sich um ein Nucleotid, bestehend aus einer Base (Uracil), einem Monosaccharid (Ribose), zwei Phosphatgruppen und Glucuronsäure. Uracil und Ribose sind durch eine N-Glycosidbindung verknüpft und bilden zusammen das Nucleosid Uridin. Uracil ist die einzige UV absorbierende Gruppe des UDPGA-Moleküls. Phosphorsäure ist esterartig an die Ribose gebunden. Von den beiden Phosphatgruppen liegt eine in labiler Form vor, die zweite erscheint mehr stabil. An das Phosphat ist die Glucuronsäure α -glycosidisch gebunden.

Nur von der α -Form des UDPGA-Moleküls kann Glucuronsäure auf ein Aglycon übertragen werden; sie ist demnach Coenzym der Glucuronyltransferase (GT) bzw. Glucuronsäuredonator. Bei der durch die GT katalysierten Reaktion entstehen Glucuronide, in denen Glucuronsäure β -glycosidisch an das Aglycon gebunden ist. Die Glucuronsäureübertragung verläuft demnach im Sinne einer Walden'schen Umkehrung.

Im Gesamtablauf der Glucuronidsynthese (Abb. 2) stellt UDPGA eine Verbindung dar, die in mehrere Reaktionszyklen integriert ist und dadurch Anschluß an verschiedene Wege des intermediären Stoffwechsels gewinnt.

Ausgangssubstanzen für die Biosynthese von UDPGA sind Glucose oder Glycogen. Durch enzymatische Reaktion von Glucose-1-Phosphat mit UTP entsteht das "aktivierte Glucose-molekül" (UDP-Glucose) und Pyrophosphat. UTP kann aus ATP durch eine entsprechende Phosphotransferase regeneriert werden. Damit bekommt der UDP-Zyklus (33) über das ADP/ATP-System Anschluß an die Atmungskettenphosphorylierung.

Zu den verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten der UDP-Glucose gehört nun die Oxydation durch die NAD-abhängige UDP-Glucose-Dehydrogenase (E.C.1.1.1.22) (17) des Zytoplasmas. Es entsteht UDPGA, der Glucuronsäuredonator bei der Glucuronyltransferase-Reaktion. Das bei der Glucuronidsynthese freiwerdende UDP kann nach Phosphatübertragung von ATP wieder als UTP mit Glucose-1-Phosphat reagieren und schließt somit den Kreis.

Hypothetisch ist noch, ob die Spaltung des bei der Bildung von UDP-Glucose entstehenden Pyrophosphats für die Synthese von UDP-Glucuronsäure limitierend ist. Bei der durch Glucose-6-Phosphatase katalysierten Pyrophosphat-spaltung würde gleichzeitig Glucose-6-Phosphat entstehen. (21)

Neben der Glucuronidbildung kann aus UDPGA durch Hydrolyse freie Glucuronsäure entstehen, oder es kann durch Decarboxylierung UDP-Xylose entstehen. D-Glucuronsäure wird enzymatisch zu L-Gulonsäure reduziert und im Glucuronsäure-

Xylulose-Zyklus weiter umgesetzt. Die phosphorylierte D-Xylulose wiederum findet Anschluß an den Pentosephosphatzyklus. L-Gulonsäure ist daneben Ausgangssubstanz für die Ascorbinsäuresynthese bei manchen Säugetieren (z.B. Ratten).

In Abbildung 4 sind noch einmal die prinzipiellen Stoffwechselwege, deren Ausgangspunkt UDPGA ist, und die dabei entstehenden Metabolite schematisch dargestellt.

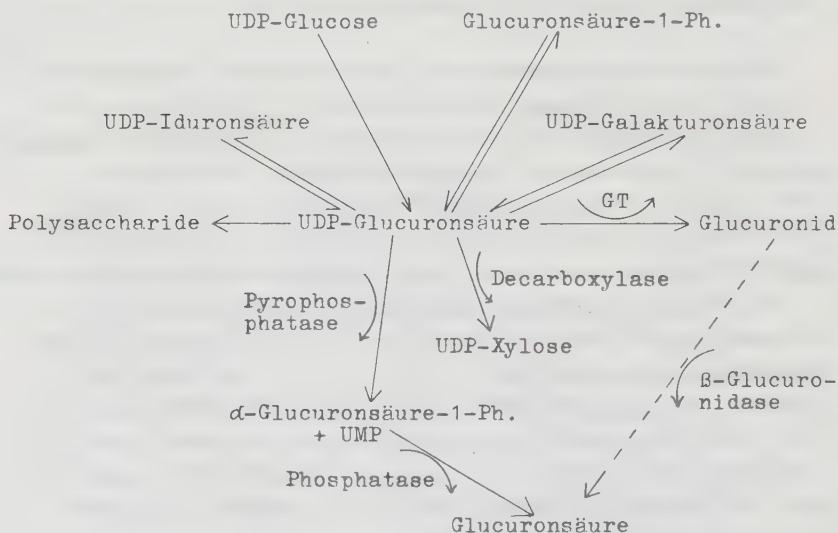


Abb. 4: Metabolismus der UDP-Glucuronsäure (13).

4. UDPGA-Bestimmung:

Im Schema der Abb. 4 ist der prinzipielle Weg für eine enzymatische Bestimmung der UDPGA schon vorgezeigt, nämlich die in vitro-Synthese von Glucuroniden mit geeigneten Substraten durch einen Überschuß an Glucuronyltransferase, wobei die in dem zu untersuchenden biologischen Material vorliegende UDPGA-Menge für die Reaktion limitierend ist. Danach kann entweder der Substratverlust bestimmt oder das entstandene Glucuronid gemessen und so auf die UDPGA-Menge geschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung besteht darin, nach Entfernung des überschüssigen Substrats in einem zweiten Reaktionsschritt das Glucuronid mittels β -Glucuronidase (E.C.3.2.1.31) (17) enzymatisch zu hydrolysieren und nun entweder die entstandene Glucuronsäure z.B. nach der FISHMAN-GREEN Methode (18) zu bestimmen oder das freigesetzte Substrat zu messen. Diese Endprodukte müssen natürlich äquimolar der zu bestimmenden UDPGA-Menge gebildet werden.

Diese Möglichkeiten enzymatischer Verfahren sind von den meisten früheren Autoren bei der Suche nach einer brauchbaren Methode zur UDPGA-Bestimmung angewendet worden.

STROMINGER u. Mitarb. (63) bestimmten 1956 die UDPGA-Menge durch Bildung von Phenolphthaleinglucuronid, indem sie die Abnahme der Absorption bei 540 nm maßen nach Inkubation von Phenolphthalein, UDPGA und Mikrosomen.

DUTTON (12) verwendete 1958 o-Aminophenol und bestimmte das durch Mäuseleberscheibchen synthetisierte Glucuronid nach dem Prinzip einer bereits 1949 von LEVY und STOREY (42) angegebenen Methode zur Messung der Glucuronidsynthese.

KAWADA (37) teilte 1960 ein verbessertes Verfahren zur UDPGA-Bestimmung mit, ausgehend von STROMINGER's Phenolphthalein-Methode (63). Durch Behandlung der Versuchsansätze mit Chloroform führte er gleichzeitig Enteiweißung und Entfernung des unkonjugierten Phenolphthaleins durch. Nach Reextraktion von Phenolphthalein aus dem Chloroform wurde dann die Absorption bei 550 nm gemessen und daraus die UDPGA-Menge berechnet. Wiederfindungsversuche mit dieser Methode ergaben $110 \pm 12,8\%$ an wiedergefundener UDPGA. Untersuchungen von biologischem Material werden von KAWADA leider nicht mitgeteilt.

MILLS und SMITH (48) gaben 1962 eine Methode zur UDPGA-Bestimmung an. Sie verwendeten o-Aminophenol als Aglycon und analysierten das nach Inkubation entstandene Glucuronid nach dem von BRATTON und MARSHALL (6) angegebenen Verfahren zur Bestimmung von Sulfonamiden. Zur Untersuchung gelangten dabei gekochte Gewebsextrakte, die den thermostabilen Faktor UDPGA enthielten. Wie auch MÜLLER-OERLINGHAUSEN (50) betont,

ist dieses Verfahren nur geeignet, um den UDPGA-Gehalt der Gewebe vergleichsweise abzuschätzen. Die Methode von MILLS und SMITH (48) wurde in den 1970 neu aufgelegt und um einen Band erweiterten "Methoden der enzymatischen Analyse" (5) nicht mehr mit aufgenommen.

TAKETA (65) teilte ebenfalls 1962 ein Verfahren zur Bestimmung der UDPGA mit, welches dem Prinzip der erstmals von ARIAS (1) beschriebenen Methode zur Bestimmung der Glucuronyltransferase-Aktivität mit 4-Methylumbelliferon (MUBF) als Glucuronsäureakzeptor folgt. Zur direkten Bestimmung des UDPGA-Gehalts von Leberhomogenaten inkubierte er diese mit MUBF, $MgCl_2$, Tris-Puffer und Mäuseleberhomogenat als GT-Quelle. Bei der indirekten Bestimmung von UDPGA der Leber wurde Gewebeskochsaft anstatt Homogenat dem Versuchsansatz zugesetzt. Mit welchen Risiken die Untersuchung von Homogenaten behaftet ist, haben eigene Versuche gezeigt. Auch die Verwendung von Kochsaft als Untersuchungsmaterial macht die Methode von TAKETA (65) nicht unproblematisch, da die Inkubation mit Mäuseleberhomogenat als GT-Quelle zur Bildung von "endogenem Glucuronid" führt, bedingt durch den UDPGA-Gehalt des Mäuseleberhomogenats. Dies muß durch Mitführen entsprechender Leerwerte beim Versuch berücksichtigt werden. TAKETA bestimmte mit seiner Methode den UDPGA-Gehalt der Leber von 15 Mäusen (♂, ausgewachsen) und fand im Durchschnitt $1,28 \pm 0,68 \mu\text{Mol UDPGA}/10 \text{ mg Leberfeuchtgewicht}$. Bei 5 normalen, menschlichen Individuen erhielt er im Mittel $3,89 \pm 0,78 \mu\text{Mol UDPGA}/10 \text{ mg Leberfeuchtgewicht}$.

HAMMAR (25) modifizierte die Methode von TAKETA 1969 dahin gehend, daß er gewaschene Mikrosomen von Meerschweinchenleber anstatt Mäuseleberhomogenat im Ansatz verwendete, um damit die "endogene Glucuronidbildung" weitgehend zu unterdrücken. Die durch Untersuchung von 10 Tieren (Normalgruppe) gewonnenen UDPGA Werte wurden auf DNA bezogen und betragen im Schnitt $0,121 \pm 0,01 \mu\text{Mol UDPGA}/\text{mg DNA}$ für Meerschweinchenleber und $0,086 \pm 0,018$ für Meerschw.-Nieren. HAMMAR konnte zeigen, daß seine Modifikation zumindest dem von MILLS und SMITH (48) angegebenen Verfahren überlegen ist.

Neben den enzymatischen Verfahren wurden auch Arbeiten vorgelegt, in denen UDPGA in Gewebsextrakten nach chromatographischer Auftrennung bestimmt wurde.

HURLBERT und POTTER (32) fanden auf diesem Wege 1954 $0,1 \mu\text{Mol UDPGA/g}$ Rattenleber (Feuchtgew.). Erstaunlich gut stimmt dieser Wert mit dem von HELDT (28) 1963 mitgeteilten Wert überein. Er fand $0,113 \mu\text{Mol UDPGA+UDP/g}$ Rattenleber, wobei beide Nucleotide bei der Chromatographie im selben Gipfel eluiert und nicht weiter aufgetrennt wurden.

Eine neuere Arbeit auf diesem Gebiet veröffentlichte ZHIVKOV (73) 1970. Darin beschrieb er eine einfache Methode zur Isolation von UDPGA durch eindimensionale Papierchromatographie und untersuchte UDPGA-Konzentration und Metabolismus in tierischen Geweben. Er bestimmte u.a. den UDPGA-Gehalt der Leber bei 10 Ratten und fand im Mittel $12,1 \pm 1,6 \mu\text{Mol UDPGA/100 g Leber}$ (Feuchtgew.). Auch dieser Wert stimmt mit den von HELDT (28) und HURLBERT u. POTTER (32) mitgeteilten Ergebnissen gut überein.

Chromatographische Verfahren zur UDPGA-Bestimmung sind jedoch nach wie vor aufwendig und langwierig und deshalb für klinische bzw. klinisch-chemische Zwecke kaum geeignet.

Auch läßt sich außer der auffällig guten Übereinstimmung der durch Rattenleberuntersuchungen gewonnenen Resultate über die Ergebnisse chromatographischer Bestimmungsmethoden nicht viel aussagen, da statistische Auswertungen, Wiederfinderversuche oder Angaben über die Reproduzierbarkeit der Werte weitgehend fehlen.

UDPGA-Bestimmungen nach dem Prinzip der enzymatischen Analyse sind weniger aufwendig, da die Trennung und Isolation der einzelnen Nucleotide entfällt; dabei bleibt die Spezifität der Methoden dadurch gewährleistet, daß GT als Meßenzym im Überschuß verwendet wird. Dafür ergeben sich bei enzymatischen Verfahren jedoch andere Schwierigkeiten, die hauptsächlich in der Aufbereitung des Untersuchungsmaterials und in der Herstellung der Enzympräparate liegen. Davon hängt es nämlich ab, ob antagonistische Wirkungen der β -Glucuronidase ausgeschaltet werden können und ob der vorzeitige Zerfall der zu bestimmenden UDPGA-Menge verhindert werden kann (13, 19).

Diese bei der enzymatischen UDPGA-Bestimmung bislang noch nicht gelösten Probleme und die Tatsache, daß deshalb alle bisher mitgeteilten Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Uridindiphosphatglucuronsäure letztlich unbefriedigend sind, waren der Anlaß der hier mitgeteilten Untersuchungen. Im einzelnen sollte überprüft werden,

- 1.) ob auf enzymatischem Wege eine vorgegebene UDPGA-Menge (als Reinsubstanz oder biologischem Material zugesetzt) zu annähernd 100 % umgesetzt werden kann und welche Voraussetzungen dafür zu schaffen sind.
- 2.) ob sich, nachdem eine brauchbare Methode zur UDPGA-Bestimmung definiert ist, durch Untersuchung tierischer Gewebe ein Zusammenhang zwischen UDPGA-Konzentration und Glucuronyltransferase-Aktivität feststellen läßt.
- 3.) Sollte untersucht werden, ob sich mit einer für die UDPGA-Bestimmung optimierten Methode "aktivierte Glucuronsäure" in menschlichem Untersuchungsmaterial (Blut, Serum, Urin, Speichel, Exsudate) nachweisen läßt und ob sich daraus neue Gesichtspunkte zur Biotransformationskapazität des menschlichen Organismus ergeben.

Material

1. Geräte:

Die Extinktionen wurden mit dem Spektralphotometer Modell PMQ II der Firma ZEISS, Oberkochen, zum Teil mit Mikroküvetteneinrichtung in MT 4 L Küvetten gemessen. Die Schichtdicke betrug im Makro- und Mikroverfahren 1,0 cm. Für die Fluoreszenzmessungen wurde der Fluoreszenzzusatz ZFM 4 zum oben genannten Gerät benutzt.

Zentrifugiert wurde mit einer Kühlzentrifuge Modell Universal Junior II KS der Firma CHRIST, Osterode/Harz. Für die Ultrazentrifugierung wurde eine Ultrazentrifuge Spinco Modell L 50 der Fa. BECKMAN Instr. benutzt.

Für pH-Messungen wurde das Labor-pH-Meter der Fa. KNICK, Berlin, mit Glaselektroden-Meßkette INGOLD Typ 405 verwendet.

Abgewogen wurde mit einer Präzisionswaage der SARTORIUS-Werke AG, Göttingen, mit optischem Anzeigebereich 1-100 mg.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einem Schüttelthermostat (Wasserbad) der Fa. B. BRAUN, Melsungen.

Die Gewebshomogenate wurden im Glashomogenisator nach POTTER-ELVEHJEM mit Teflonstempel maschinell hergestellt.

2. Reagenzien:

β -Methylumbelliferon ("reinst") von Fa. SCHUCHARDT, München, β -Methylumbelliferylglucuronid und Triton X-100 von Fa. SERVA-Feinbiochemica, Heidelberg; Uridin-5'-diphospho-glucuronat als di-Natriumsalz von Fa. BOEHRINGER, Mannheim; β -Glucuronidase (aus E.coli) von Fa. SIGMA CHEMICAL COMPANY, St.Louis, USA; alle übrigen Substanzen, Lösungen und Lösungsmittel als "pro analysi"-Chemikalien von Fa. E. MERCK, Darmstadt.

Alle wäßrigen Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

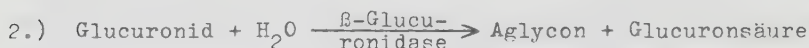
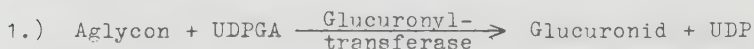
3. Versuchstiere:

10 männliche mischrassige Meerschweinchen (350 - 450 g) und 10 weibliche WISTAR-Ratten (200 - 250 g) wurden untersucht. Alle Tiere wurden mit Latzfutter und Leitungswasser aus Trinkflaschen ad libitum gefüttert.

Experimenteller Teil

Ziel der angestellten Versuche war es, eine enzymatische Methode zur Bestimmung von UDPGA auszuarbeiten, die relativ einfach und für Serienbestimmungen geeignet sein und eine spezifische Messung kleinster UDPGA-Mengen in biologischem Material ermöglichen sollte mit einer Genauigkeit, die für biologische Untersuchungen ausreichend und chromatographischen Methoden überlegen sein sollte. Als Grundlage diente die von HAMMAR (25) modifizierte Methode nach TAKETA (65).

Prinzip:



Es handelt sich hierbei um ein Bestimmungsverfahren, das zwei Reaktionsschritte beinhaltet, die beide nach dem Prinzip der "enzymatischen Analyse" ablaufen. Dabei wird die enzymatische Substratbestimmung als Endwertbestimmung durchgeführt, die darauf beruht, daß das gesamte "Substrat" (in diesem Fall UDPGA) umgesetzt wird.

Als Aglycon wird β -Methylumbelliferon (MUBF) verwendet, ein 4-Methyl-7-hydroxycumarin. Diese Substanz hat ein Moleku-

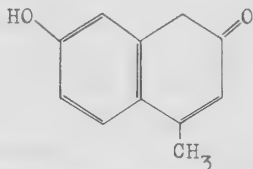


Abb. 5: β -Methylumbelliferon

largewicht von 176,17 und ist löslich in Alkohol, Chloroform, Alkali und in kochendem Wasser (1g in 100 ml). In Lösung ist MUBF in alkalischem Bereich stark fluoreszierend (Anregungsmaximum 340 nm, Emissionsmaximum 450 nm). Nach Konjugation mit Glucuronsäure zeigt das entsprechende Glucuronid (Abb. 6) unter denselben Bedingungen keine Fluoreszenz mehr (52).

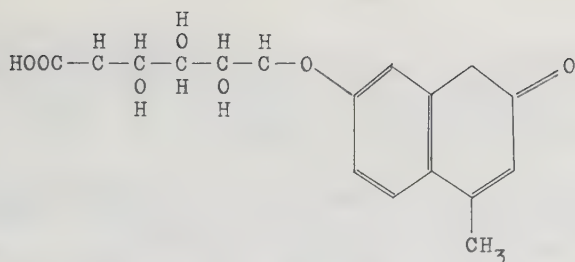


Abb. 6: Methylumbelliferylglucuronid

Beim 1. Reaktionsschritt des Bestimmungsverfahrens liegt das Gleichgewicht der Reaktion bei pH 7,5 praktisch auf der rechten Seite (19), sodaß bei einem vollständigen Umsatz von UDPGA eine äquimolare Glucuronidmenge entstehen muß. Nach DUTTON (13) ist eine Glucuronsäureübertragung von 100 % möglich; inwieweit ein Umsatz von 100 % erreicht wird, hängt jedoch davon ab, wie frei das verwendete Glucuronyltransferase-Präparat von Enzymen ist, die Nebenreaktionen katalysieren.

Neben der Forderung nach einem Umsatz von annähernd 100 % muß sichergestellt sein, daß im biologischen Material bzw. im Inkubationssystem kein vorzeitiger UDPGA-Zerfall durch Parasitenreaktionen auftritt. Entscheidend dafür, daß die tatsächliche UDPGA-Konzentration gemessen wird, ist die Aufbereitung und Handhabung des Untersuchungsmaterials.

Nachdem die Synthese von Methylumbelliferylglucuronid (MUGA) im 1. Reaktionsschritt beendet ist, wird das Inkubationsgemisch mit Chloroform ausgeschüttelt. Dadurch erreicht man gleichzeitig Enteiweißung und Extraktion des überschüssigen nicht konjugierten MUBF.

Im 2. Reaktionsschritt erfolgt die enzymatische Hydrolyse von Methylumbelliferylglucuronid durch die β -Glucuronidase. Es entstehen freie Glucuronsäure und Methylumbelliferon proportional der in der 1. Reaktion umgesetzten UDPGA-Menge. Das freigesetzte MUBF läßt sich nach Alkalisierung fluorometrisch bestimmen, und daraus kann dann die UDPGA-Konzentration des Untersuchungsmaterials mittels einer Eichkurve berechnet werden.

Bei den Untersuchungen zur UDPGA-Bestimmung wurde ausgegangen von folgender Arbeitsvorschrift, die dann im einzelnen überprüft und optimiert wurde:

1. Ansatz: 0,20 ml Organkochsaft (aus Gewebe/Wasser=1:1)
0,04 ml 0,1 %ige $MgCl_2$ -Lösung
0,20 ml 1 mM MUBF in 0,01 M Tris pH 10,3
0,46 ml 0,35 M Tris-Puffer pH 7,6
0,10 ml Mikrosomensuspension

1,00 ml Gesamtvolumen

Der Ansatz wird 12 min im Wasserbad bei 37°C geschüttelt, zweimal je 10 min mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt und 5 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Für den 2. Ansatz werden 0,20 ml der wässrigen Phase benötigt:

2. Ansatz 0,20 ml wässrige Phase (Chloroformextrakt)
0,40 ml 0,2 M Tris-Puffer pH 7,0
0,20 ml β -Glucuronidaselösung (100 E=1,2 mg/ml)

Nach 2 Std. Schütteln bei 37°C wird mit 2,8 ml Glycin-Puffer 0,5 M, pH 10,35 aufgefüllt und die Fluoreszenz gegen einen Chininstandard (0,4 μ g/ml 0,1 n H_2SO_4) gemessen.

1. Enzympräparation:

a) Leberhomogenat (postnuclear supernatant)

Ein 20 %iges (g/v) Leberhomogenat (Ratte o. Meerschweinchen) in 0,154 M KCl-Lösung wird 10 min bei 1470 x g zentrifugiert. Der Überstand wird als GT-Quelle bei der Glucuronyltransferase-Reaktion verwendet.

Es läßt sich so schnell und ohne großen Aufwand ein Enzympräparat herstellen, welches das Meßenzym GT mit ausreichender Aktivität enthält. MULDER (49) konnte durch Aktivierung von Rattenleberhomogenat mit 0,3 % (v/v) Triton X-100 die MUBF-Konjugation um das 20-fache steigern. Allerdings enthalten Homogenate u.a. auch UDPGA, was zu der von TAKETA (65) beschriebenen "endogenen Glucuronidbildung" führt, die sich in entsprechend hohen Leerwerten der Ansätze ausdrückt.

b) Mikrosomensuspension:

Ein 10 %iges Homogenat von Meerschweinchenleber in 0,15 M KCl wird 10 min bei 10.000-g zentrifugiert, der Überstand anschließend 60 min bei 105.000-g. Das der Mikrosomenfraktion entsprechende Sediment wird in 0,15 M KCl resuspendiert und noch einmal 45 min bei 105.000-g in der Ultrazentrifuge geschleudert. Um reine Mikrosomenpräparate für die UDPGA-Bestimmung zu erhalten, wird das Sediment erneut in 0,15 M KCl aufgenommen und per Hand homogenisiert. Danach wird die Ultrazentrifugation wiederholt. Die so gewaschenen Mikrosomen werden dann in soviel 0,15 M KCl fein suspendiert, daß 1 ml Suspension die Mikrosomen von 1 g Gewebe enthält. Die Mikrosomen sind bei -23°C über Wochen ohne wesentlichen Aktivitätsverlust haltbar, sofern sie nicht zwischenzeitlich aufgetaut werden.

Bei der Verwendung gewaschener Meerschweinchenlebermikrosomen als Meßenzym ist die endogene Glucuronidbildung praktisch zu vernachlässigen, weil alle Faktoren, die die Synthese von UDPGA steigern, wie UDP-Glucose-Dehydrogenase, ATP und NAD sowie UDPGA selbst, in gewaschenen Mikrosomen nicht mehr nachweisbar sind (25).

Nicht ganz auszuschließen ist eine geringe Aktivität lysosomaler β -Glucuronidase in der heterogenen Mikrosomenfraktion, die antagonistisch zur GT-Reaktion wirkt. Da diese β -Glucuronidase jedoch mit niedrigem pH-Optimum (pH um 4) arbeitet und die Hydrolyse im Vergleich zur Glucuronidsynthese viel langsamer abläuft, kann diese antagonistische Wirkung bei der UDPGA-Bestimmung nicht beobachtet werden. Dieses bestätigen auch Versuche mit Saccharo-1,4-lacton, einem spezifischen β -Glucuronidaseinhibitor (18), dessen Anwendung nicht zu einer Steigerung des UDPGA-Umsatzes führt.

2. Einfluß von Aktivatoren:

Verschiedene Aktivatoren der mikrosomalen Glucuronyltransferase wurden untersucht. Dabei zeigten ATP, UDP-N-acetylglucosamin und Calciumionen keinen Einfluß auf den UDPGA-Umsatz bei der GT-Reaktion. Auch durch Gluthation und Cystein, die das Enzym GT vor Hemmstoffen (verschiedene SH-Reagenzien (19))

schützen sollen, konnte die UDPGA-Umsatzrate im Inkubationssystem nicht verändert werden. Lediglich durch die Behandlung der Mikrosomensuspension mit Triton X-100, einem nichtionischen Detergens, und durch Magnesiumionen ließ sich der Umsatz einer bestimmten vorgegebenen UDPGA-Menge deutlich steigern.

a) Triton X-100:

Eine wäßrige Lösung von Triton X-100 wird der zum Gebrauch aufgetauten Mikrosomensuspension zugesetzt. Dann werden die so behandelten Mikrosomen mit dem Reaktionsgemisch inkubiert. Die optimale Triton-Konzentration der Mikrosomensuspension beträgt dabei 0,3 - 0,4 % (v/v) (Abb. 7). Im Optimum ist die durch aktivierte Mikrosomen umgesetzte UDPGA-Menge um etwa 7 % größer als in Ansätzen mit unbehandelten Mikrosomen bei sonst gleichen Bedingungen.

Den Einfluß von Triton X-100 auf die GT-Aktivität der Mikrosomenpräparate zeigen die Zeit-Umsatz-Kurven in Abbildung 8. Die GT-Aktivität wurde nach der von PERONA u. Mitarb. (52) angegebenen Methode bestimmt mit 0,05 ml Mikrosomensuspension pro Ansatz bei 1,0 ml Gesamtvolumen. Durch unbehandelte Mikrosomen werden in 30 min 95 % des vorhandenen Substrats (MUBF) umgesetzt; bei den mit Triton aktivierten Mikrosomen ist dieser Wert bereits nach 10 min erreicht.

b) Magnesiumionen:

Um die günstigste Magnesiumionen-Konzentration für den Glucuronyltransfer zu ermitteln, wurden den Ansätzen verschieden molare Magnesiumchlorid-Lösungen zugesetzt, sodaß sich im Test Konzentrationen von 0 - 10 mM $MgCl_2$ einstellten. Nach Inkubation mit Tris-Puffer, UDPGA- Na_2 und aktivierten Mikrosomen zeigte sich, daß in den Ansätzen mit $MgCl_2$ -Konzentrationen zwischen 4 und 6 mM am meisten UDPGA umgesetzt wurde (Abb. 9). Für alle weiteren Ansätze wurde eine $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM gewählt. Als optimal für die GT-Aktivität werden Magnesiumionen-Konzentrationen bei anderen Autoren angegeben von 4 mM (72), 5 mM (31, 49), 6,25 mM (65), 12 mM (52) und 16 mM (19).

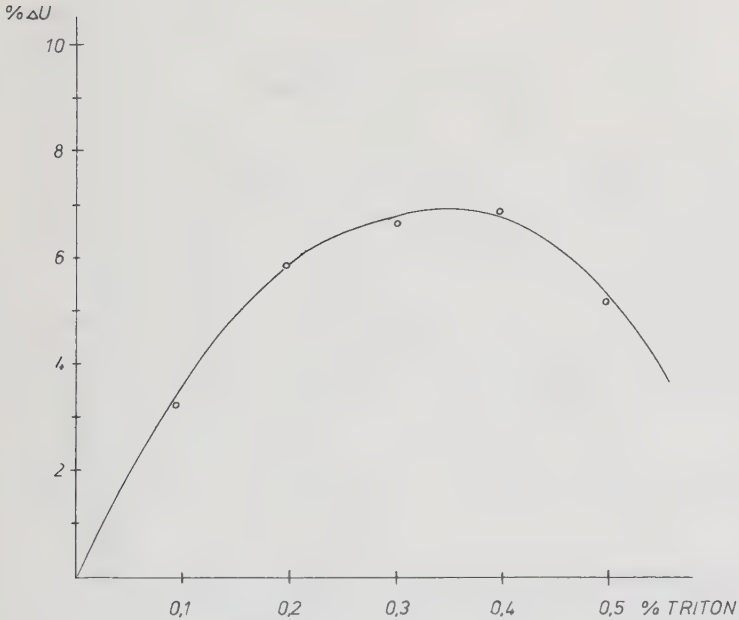


Abb. 7: Einfluß der Triton X-100-Konzentration auf den UDPGA-Umsatz.

Die Ansätze enthielten 160 μMol Tris-HCl-Puffer ($\text{pH}=7,6$), 0,2 μMol MgCl_2 , 0,2 μMol MUBF, 0,044 μMol UDPGA- Na_2 und 0,1 ml Mikrosomensuspension, die jeweils 0,1-0,5 %ig (v/v) an Triton X-100 waren. Gesamtvol.: 1 ml, Inkubation: 30 min bei 37°C .

Angegeben ist die UDPGA-Umsatzsteigerung (ΔU) in % gegenüber den Proben, die Mikrosomen ohne Triton enthielten.

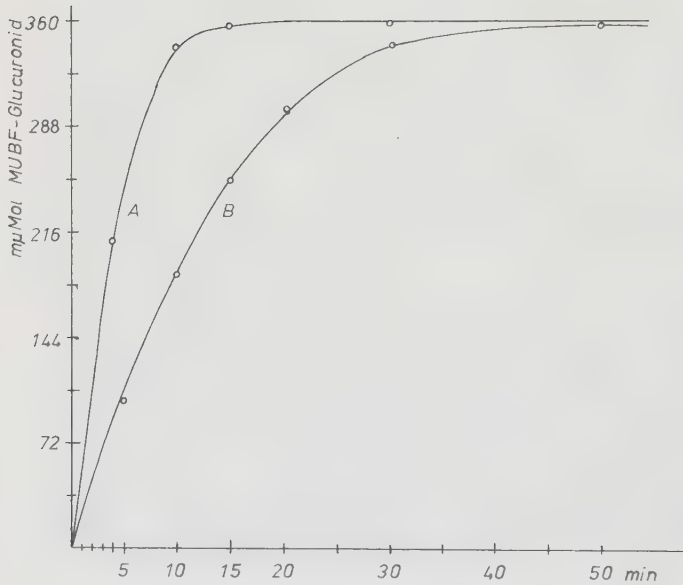


Abb. 8: Einfluß von Triton X-100 auf die MUBF-Konjugation.

Ansätze wie bei der Glucuronyltransferase-Aktivitätsbestimmung nach PERONA (52) (s.S. 61): 30 μ Mol Tris-HCl-Puffer, (pH 7,5), 12 μ Mol $MgCl_2$, 0,36 μ Mol MUBF, 1,6 μ Mol UDPGA und 0,05 ml Mikrosomensuspension. Gesamtvolumen: 1 ml, inkubiert bei 37°C.

A = Zeit-Umsatz-Kurve der Ansätze mit aktivierten Mikrosomen (+ 0,4 % Triton)

B = Zeit-Umsatz-Kurve der Ansätze mit unbehandelten Mikrosomen (ohne Triton)

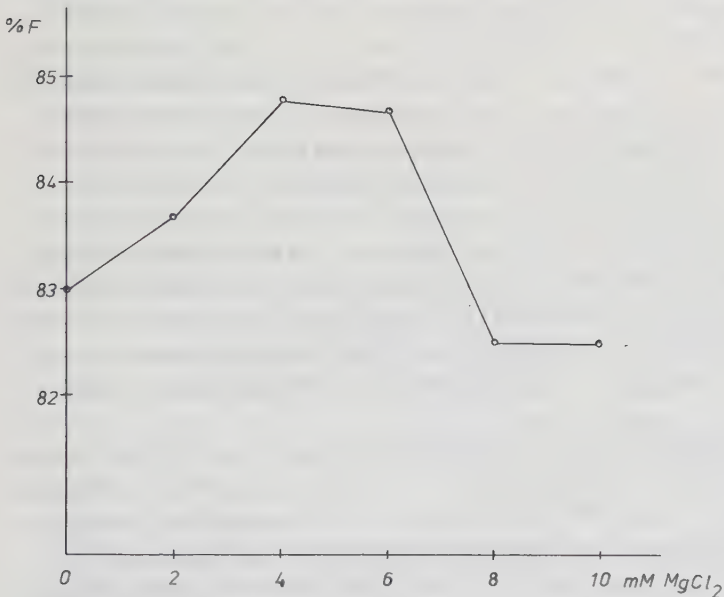


Abb. 9: Einfluß der Magnesiumionen-Konzentration auf den UDPGA-Umsatz.

Die Ansätze enthielten 75 μ Mol Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 0,4 μ Mol MUBF, 0,04 μ Mol UDPGA- Na_2 , 0 - 10 μ Mol $MgCl_2$ und 0,05 ml Mikrosomen 0,4 %ig an Triton. Gesamtvolumen: 1 ml, Inkubation: 20 min bei 37°C.

Aufgetragen ist die dem UDPGA-Umsatz proportionale Fluoreszenzintensität (%F) des freigesetzten MUBF (nach Hydrolyse durch β -Glucuronidase) gegen die $MgCl_2$ -Konzentration der einzelnen Ansätze.

3. Enzym-Menge:

Nach dem Prinzip der "Enzymatischen Analyse" muß das Meßenzym im Überschuß vorliegen, damit die Substrat-Konzentration zum limitierenden Faktor der Reaktion wird, von dem das Ergebnis der Endwertbestimmung abhängt. Welche Enzym-Konzentration, d.h. Mikrosomenmenge pro Testansatz, für die UDPGA-Bestimmung am günstigsten ist, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Einmal muß sichergestellt sein, daß das Meßenzym ausreicht, um innerhalb einer möglichst kurzen Inkubationszeit die vorliegende UDPGA-Menge umzusetzen. Die zur Inkubation verwendete Menge an Mikrosomensuspension darf jedoch auch nicht zu groß gewählt werden, da damit die Proteinbelastung der Ansätze steigt, was bei fluorometrischen Bestimmungen zu unvorhersehbaren Löscheffekten führen kann. Außerdem nimmt mit steigendem Eiweißgehalt die Proteinpräzipitation beim Ausschütteln der Ansätze mit Chloroform zu, was sich nachteilig auf die Wiederfindung von MUBF-Glucuronid auswirkt.

Vorversuche zeigten, daß bei Ansätzen mit einer Proteinkonzentration von weniger als 1,3 mg Protein pro ml Ansatz keine auffälligen MUBF-Glucuronid-Verluste mehr auftraten. Der Proteingehalt der Mikrosomensuspensionen war im Mittel 11,5 mg Protein/ml, bestimmt nach der Biuret-Methode (58). Demnach ist es möglich, bis zu 0,1 ml Mikrosomensuspension pro Ansatz (1 ml Gesamtvolumen) zu inkubieren, ohne daß ein wesentlicher MUBF-Verlust hingenommen werden muß. Diese Mikrosomenmenge ist auch notwendig, um solche UDPGA-Mengen, wie sie in dem an UDPGA reichsten biologischen Material (Meerschweinchenleber) auftreten können, innerhalb von 30 min annähernd vollständig umsetzen zu können. Bei der Verwendung von 0,1 ml Mikrosomensuspension/ml Ansatz ist jedoch zu berücksichtigen, daß auch mit dem Untersuchungsmaterial Protein in die Ansätze gelangt (z.B. Organkochsaft enthält noch bis zu 6 mg Protein/ml), wodurch die zulässige Eiweißkonzentration schnell überschritten wird.

Es hat sich deshalb als günstiger erwiesen, mit kleineren Mikrosomenmengen zu arbeiten. Das ist auch möglich durch die

Verwendung von Mikrosomen-Präparaten, die mit Triton X-100 aktiviert sind. Von den so behandelten Mikrosomensuspensionen reichen schon 0,02 ml pro Ansatz aus, um UDPGA-Konzentrationen der zu erwartenden Größenordnung bestimmen zu können.

Bei allen weiteren Versuchen wurde mit einer Menge von 0,05 ml aktivierter Mikrosomensuspension pro Ansatz (1 ml) gearbeitet.

4. Substrat-Konzentration:

Bei DUTTON (13) verhielt sich die Menge des in vitro synthetisierten Glucuronids dann proportional zur UDPGA-Konzentration, wenn das Akzeptor-Substrat (o-Aminophenol) in etwa 5-fachem Überschuß im Inkubationssystem vorhanden war.

Um zu prüfen, welche MUBF-Konzentration für einen vollständigen UDPGA-Umsatz notwendig bzw. am günstigsten ist, wurden verschiedenen Versuchsansätze mit konstanter UDPGA-Menge bei ansteigender MUBF-Konzentration inkubiert. Dabei wurden die molaren MUBF-Konzentrationen so gewählt, daß sie zum Teil unter und über der zur Verfügung stehenden UDPGA-Menge lagen. Trägt man den UDPGA-Umsatz in % gegen die MUBF-Molarität der Ansätze auf, so erhält man das in Abbildung 10 dargestellte Diagramm.

In dem Bereich, wo die MUBF-Konzentration kleiner ist als die der UDPGA, steigt die Kurve linear an. Hier wird die Glucuronidsynthese durch die vorhandene MUBF-Menge limitiert. Die Kurve geht dann im Bereich mit ansteigendem MUBF-Überschuß allmählich zu einem waagerechten Verlauf über, wo der UDPGA-Umsatz seinen höchsten Wert erreicht hat und auch durch höhere MUBF-Konzentrationen nicht mehr zu steigern ist.

Wie das Diagramm (Abb. 10) zeigt, genügt praktisch ein 3,2-facher MUBF-Überschuß, um einen vollständigen UDPGA-Umsatz zu erreichen (30 min Inkubationszeit). Damit in jedem Fall ein genügender MUBF-Überschuß gewährleistet ist, wurde für die UDPGA-Bestimmung eine Konzentration von 0,2 mM MUBF im Test bei Inkubation gewählt. Eine beliebige Erhöhung der MUBF-Menge pro Ansatz ist nicht sinnvoll, da dadurch die Chloroformextraktion des Überschusses unnötig erschwert würde.

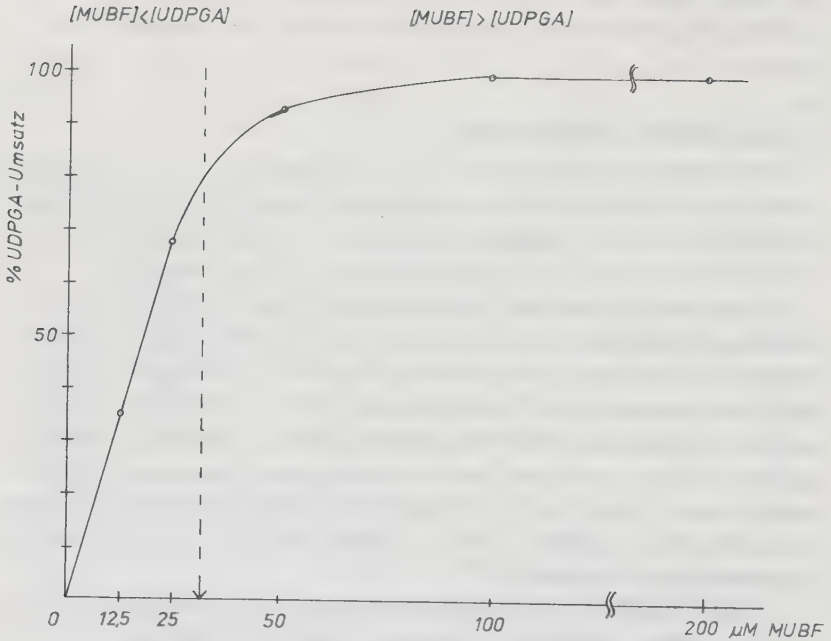


Abb. 10: Einfluß der MUBF-Konzentration auf den UDPGA-Umsatz.

Ansätze: 75 μMol Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 5 μMol $MgCl_2$, 0,045 μMol UDPGA- Na_2 , 12,5 - 200 μMol MUBF und 0,05 ml Mikrosomen + Triton 0,4 %ig. Gesamtvolumen: 1 ml, inkubiert 30 min bei 37°C.

5. Puffer-System:

Aus einer Reihe von Puffergemischen wurde Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)-Puffer als der günstigste ausgewählt, weil die für die GT-Reaktion erforderliche Wasserstoffionen-Konzentration (um pH 7,5) im Bereich des Puffers liegt und weil Tris relativ gute Puffereigenschaften auch bei stark herabgesetzter Konzentration bzw. Ionenstärke hat.

a) pH-Optimum:

Um die günstigste Wasserstoffionen-Konzentration für einen vollständigen Glucuronyltransfer zu ermitteln, wurden Ansätze zur Glucuronidsynthese mittels Tris-HCl-Puffer auf verschiedene pH-Werte (7,0 - 8,2) eingestellt und 30 min inkubiert.

Trägt man die jeweils glucuronidierte Menge an MUBF auf der Ordinate und den dazugehörigen pH-Wert auf der Abszisse eines Achsenkreuzes ab, so erhält man eine Kurve, deren Gipfel das pH-Optimum der Reaktion anzeigt (Abb. 11). Für die hier gewählten Bedingungen der enzymatischen UDPGA-Bestimmung ergibt sich ein pH-Optimum bei pH 7,6.

b) Ionenstärke:

Auch die Konzentration des Tris-HCl-Puffers zeigt einen nicht geringen Einfluß auf den UDPGA-Umsatz. Senkt man die Molarität des Tris-Puffers, so steigern sich die während 30 min umgesetzten UDPGA-Mengen, bis sich dann bei weiterer Verdünnung des Puffers die Umsatzrate wieder verringert. Die Verwendung zu stark verdünnter Puffer ist auch deshalb nicht ratsam, da befürchtet werden muß, daß sonst der pH-Wert gemäß den individuellen Eigenschaften des inkubierten Untersuchungsmaterials von Fall zu Fall von dem des Ansatzpuffers abweicht.

Als am günstigsten für den UDPGA-Bestimmungsansatz hat sich eine Konzentration von 75 mM Tris-HCl-Puffer im Test erwiesen, eingestellt auf pH 7,6 (Abb. 12).

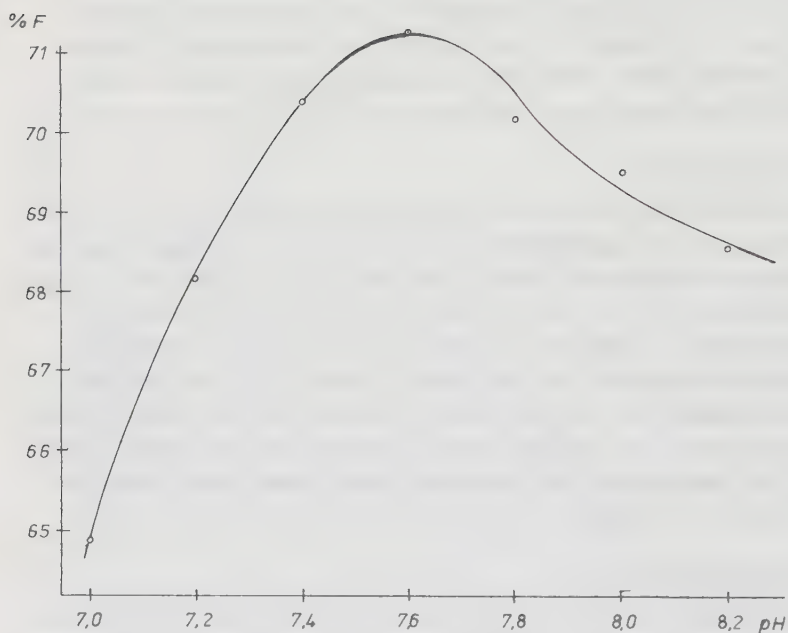


Abb. 11: Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Glucuronyltransferase-Reaktion.

Ansätze: 75 μ Mol Tris-HCl-Puffer (pH 7,0 - 8,2), 5 μ mol $MgCl_2$, 0,2 μ Mol MUBF, 0,035 μ Mol UDPGA- Na_2 und 0,05 ml Mikrosomen (+ 0,4% Triton) bei 1 ml Gesamtvolumen inkubiert 30 min bei 37°C.

UDPGA-Umsatz bei den verschiedenen pH-Werten aufgetragen als Fluoreszenz der Proben (= freigesetzten MUBF).

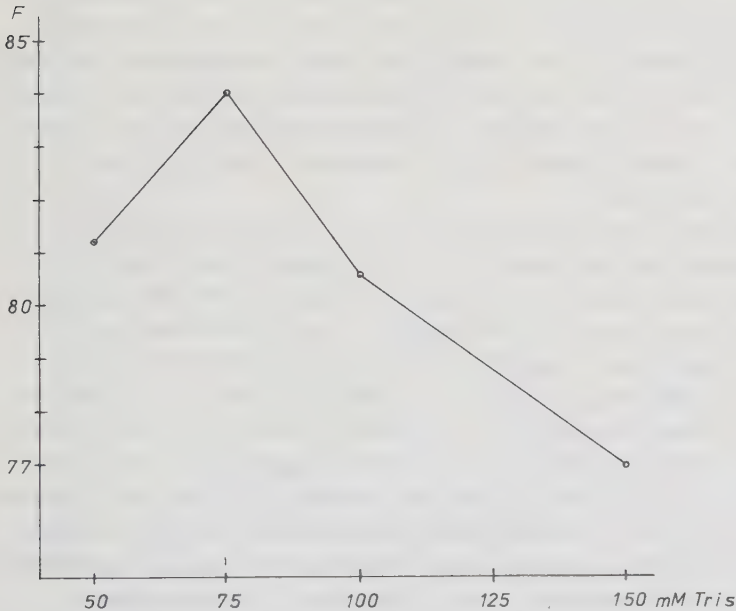


Abb. 12: Einfluß der Konzentration des Tris-HCl-Puffergemisches auf den UDPGA-Umsatz.

Ansätze: 50 -150 μ Mol Tris-Puffer (mit HCl jeweils auf pH 7,6 eingestellt), 0,038 μ Mol UDPGA- Na_2 , 0,2 μ Mol MUBF, 5 μ Mol MgCl_2 und 0,05 ml Mikrosomen (0,4 %ig an Triton) 30 min bei 37°C inkubiert. Gesamtvol.: 1 ml.
F = Fluoreszenzwert der Proben (proportional UDPGA-Umsatz)

6. Inkubationsbedingungen:

a) Inkubationszeit

Die Inkubationszeit soll grundsätzlich so kurz wie möglich gewählt werden, da sonst die Gefahr besteht, daß das Meß-Enzym langsam denaturiert wird oder sich durch unerwünschte Nebenreaktionen die Substrate oder Reaktionsprodukte im Laufe der Zeit zersetzen. Bei der enzymatischen Analyse muß jedoch im Gegensatz zu Enzym-Aktivitätsbestimmungen genügend lange inkubiert werden, damit ein vollständiger Substratumsatz gewährleistet ist.

Einblick in den zeitlichen Verlauf der Glucuronyltransferase-Reaktion mit aktivierten Mikrosomen als GT-Quelle gibt die Zeit-Umsatz-Kurve in Abbildung 13. Wie der Kurvenverlauf zeigt, startet die Reaktion mit großer Anfangsgeschwindigkeit, und nach 5 min sind praktisch 98 % der vorhandenen UDPGA-Menge umgesetzt. Nach weiteren 5 min ist der maximale Umsatz erreicht, die Reaktion kommt zum Stillstand, da keine UDPGA zur Glucuronsäureübertragung mehr zur Verfügung steht. Die Kurve bildet ein Plateau parallel zur Abszisse, welches auch bei Inkubationszeiten von über 30 min noch unverändert bleibt. Dieses zeigt, daß eine Spaltung von β -Methylumbelliferylglucuronid durch lysosomale β -Glucuronidase nicht eintritt, sonst müßte die Kurve eine abfallende Tendenz zeigen.

Auf Grund der Zeit-Umsatz-Kurve wurde für die UDPGA-Bestimmung eine Inkubationszeit von 15 min als ausreichend angesehen und, wenn nicht anders angegeben, bei den weiteren Versuchen eingehalten.

b) Inkubationstemperatur

Versuche mit verschiedenen Inkubationstemperaturen von 30-45°C erbrachten keine auffälligen Unterschiede bezüglich des UDPGA-Umsatzes der Ansätze, sodaß die gebräuchliche Inkubationstemperatur von 37°C zur Anwendung kam.

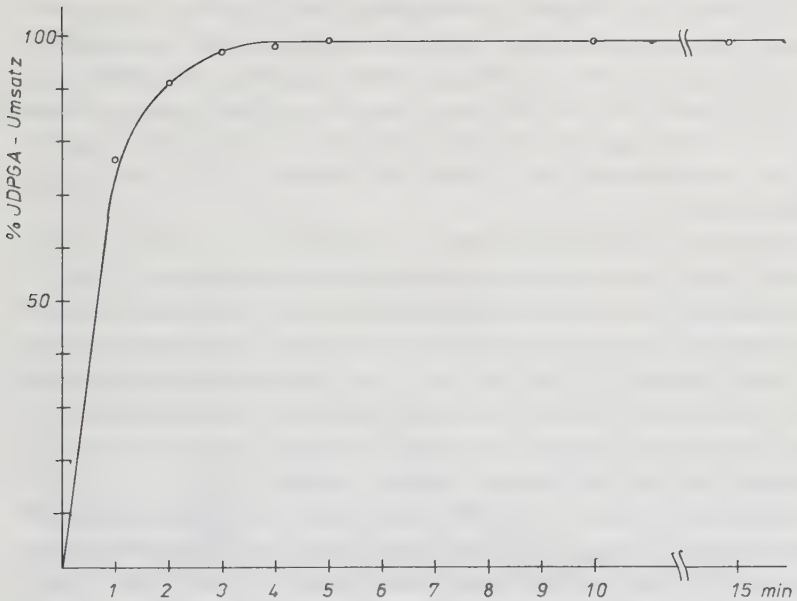


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Glucuronyltransferase-Reaktion (Zeit-Umsatz-Kurve "UDPGA").

Ansätze: 75 μ Mol Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 5 μ Mol $MgCl_2$, 0,2 μ Mol MUBF, 0,038 μ Mol UDPGA- Na_2 , 0,05 ml Mikrosomen (0,4 %ig an Triton) inkubiert bei 37°C 1 - 15 min.

Gesamtvol.: 1 ml.

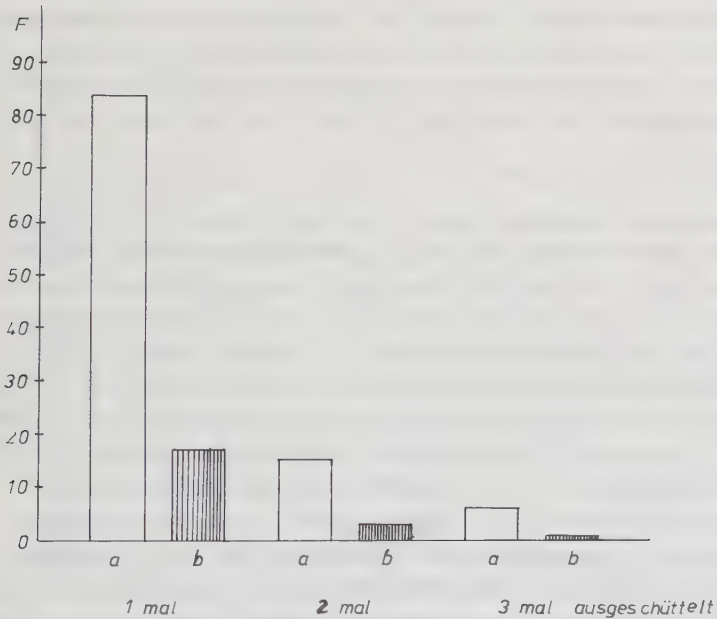
7. Enteiuweißung und MUBF-Extraktion:

Durch das Ausschütteln der Ansätze mit Chloroform erfolgt gleichzeitig die Denaturierung der Proteine und die Extraktion des überschüssigen β -Methylumbelliferons. Nach dem Ausschütteln bildet sich je nach Eiweißgehalt der Ansätze mehr oder weniger Proteinpräzipitat, welches sich beim Zentrifugieren zwischen Chloroform und wäßrige Phase absetzt. Man erhält so einen klaren Überstand, der kein freies MUBF mehr aufweisen soll. Ein Teil des Überstandes gelangt in den zweiten Ansatz, in dem die Hydrolyse von β -MUBF-Glucuronid durch β -Glucuronidase erfolgt.

Der Ausschüttelvorgang stellte zunächst ein technisches Problem dar, da die üblichen Schüttelapparaturen mit horizontaler Hin- und Herbewegung nur eine unvollkommene und ungleichmäßige Extraktion des überschüssigen MUBF ermöglichten. Auch wenn zweimal 10 min mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt wurde, waren die Leerwerte so hoch und die Abweichung der Doppelwerte voneinander so stark, daß ein maschinelles Ausschütteln nicht in Frage zu kommen schien.

Das Ausschütteln der Ansätze per Hand in verschlossenen Reagenzgläsern führte zwar zu einer besseren MUBF-Extraktion, brachte aber auch große Ungenauigkeiten mit sich. Erst die Entwicklung eines speziellen Schüttelsystems führte zu befriedigenden Resultaten:

Die Ansätze werden in Einmalröhrchen (14 ml) aus Kunststoff pipettiert und nach der Inkubation mit 7 ml Chloroform aufgefüllt. Zum festen Verschließen der Röhrchen eignen sich Kunststoffröhrchen der gleichen Art, die auf Fingerhutgröße abgeschnitten werden. Die so verschlossenen Gefäße werden in einen Reagenzglasständer geschoben, der mit 45° Neigung an einer durch Exzenter bewegten Stange befestigt ist. Mittels einer Abdeckplatte werden die Röhrchen im Ständer fixiert. Nach Einschalten des Motors erfolgt eine heftige, kreisende Schüttelbewegung, die nach 1 min beendet werden kann. Die Röhrchen bleiben danach so lange stehen, bis sich aus der milchigen Emulsion Chloroform und Ansatz wieder abgetrennt



Tab. 1: Ausschüttелеffekt durch manuelle und maschinelle Chloroform-Extraktion dargesellt anhand der Restfluoreszenzen (F) der Proben.

Ansätze: 75 μ Mol Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 5 μ Mol $MgCl_2$, 0,2 μ Mol MUBF, 0,04 μ Mol UDPGA- Na_2 , 0,05 ml aktivierte Mikrosomen. Gesamtvolumen: 1 ml.

a = Probe per Hand jeweils 3 min im Reagenzglas mit 10 ml Chloroform ausgeschüttelt.

b = Probe im Schüttelsystem (maschinell) jeweils 1 min mit 7 ml Chloroform ausgeschüttelt.

haben. Mit einer 10 ml Rekordspritze, auf die ein dünner Plastikschauch gesteckt ist, wird das gebrauchte Chloroform aus den Röhrchen gezogen. Diese werden erneut mit 7 ml CHCl_3 gefüllt, und der Ausschüttelvorgang wird wiederholt. Danach können die Ansätze sofort abzentrifugiert werden.

Der unterschiedliche Ausschüttelleffekt bei Anwendung des Schüttelsystems und bei manueller Chloroform-Extraktion kommt in dem Säulendiagramm der Tabelle 1 deutlich zum Ausdruck. Dargestellt sind die durch nicht extrahiertes MUBF bedingten Restfluoreszenzen der Ansätze, die mit den Analysen-Leerwerten vergleichbar sind.

Durch einen weiteren Versuch sollte festgestellt werden, wie sich das Ausschütteln auf die Wiederfindung von β -MUBF-Glucuronid als freies MUBF auswirkt. Dazu wurden zwei Gruppen von Ansätzen vorbereitet, die alle dieselbe Menge β -MUBF-Glucuronid und Tris-Puffer enthielten. Der einen Gruppe wurden nun Organkochsaft und Mikrosomensuspension zugesetzt, bei der zweiten Gruppe wurde mit einem aliquoten Teil Aqua dest. aufgefüllt. Von beiden Gruppen wurde nun jeweils die Hälfte der Ansätze zweimal mit 7 ml Chloroform in oben beschriebener Weise ausgeschüttelt, die andere Hälfte wurde nicht ausgeschüttelt. In den Ansätzen mit Gewebsextrakt und Mikrosomen bildete sich durch das Ausschütteln ein Proteinpräzipitat, was bei den mit Aqua dest. aufgefüllten Proben natürlich nicht der Fall war. Nach dem Zentrifugieren wurden alle Ansätze wieder gleich behandelt. Die Überstände wurden mit β -Glucuronidase inkubiert und die Fluoreszenz des freigesetzten MUBF gemessen (Tab. 2).

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, unterscheiden sich die aus den verschiedenen Ansatzreihen hervorgehenden Mittelwerte nicht signifikant voneinander. Die Differenz zwischen den ausgeschüttelten und den nicht ausgeschüttelten Ansätzen ist bei der proteinhaltigen Gruppe sogar noch kleiner als bei den Ansätzen ohne Präzipitatabildung. Wie der Versuch zeigt, wird die Wiederfindung von β -MUBF-Glucuronid als MUBF weder durch das Ausschütteln noch durch die Proteinpräzipitation wesentlich beeinträchtigt.

Tab. 2: Einfluß des Ausschüttelns mit Chloroform auf die Wiederfindung von MUBF-Glucuronid als MUBF in wäßrigen und proteinhaltigen Ansätzen.

Ansatz	A	B	C	D
Fluoreszenz- intensität(%F) des freigesetzten MUBF	61,5	61,0	61,0	60,0
	63,0	61,5	60,5	60,5
	63,5	63,0	62,0	60,5
	63,0	62,5	60,0	59,5
	65,5	62,0	57,5	59,0
Mittelwert ($\bar{x}$)	63,3	62,0	60,2	59,9
Stand.Abw. (s_x)	1,44	0,79	1,68	0,65

Ansätze: 0,20 ml MUBF-Glucuronid (0,05 mg/ml) und
0,55 ml Tris-HCl-MgCl₂-Gemisch wurden auf-
gefüllt bei den Proben der Reihe:

- A mit 0,25 ml Aqua dest. und nicht ausgeschüttelt,
- B mit 0,25 ml Aqua dest. und 2 mal "
- C mit 0,25 ml Proteinlös. u. nicht "
- D mit 0,25 ml Proteinlös. u. 2 mal "

(Proteinlösung = Kochsaft- u. Mikrosomengemisch)

Auswertung: Im t-Test für verbundene Stichproben er-
wiesen sich die Mittelwertsdifferenzen zwischen
den Reihen A-B und C-D als nicht signifikant.
(A-B: $t = 2,233$, C-D: $t = 0,583$, $N = 5$)

8. Hydrolyse mit β -Glucuronidase:

Die Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von Glucuronid durch β -Glucuronidase ist vergleichsweise unproblematisch, da das zur Reaktion benötigte Substrat β -Methylumbelliferyl-Glucuronid als "pro Analysi"-Substanz im Handel erhältlich ist und auch verschiedene Präparate von β -Glucuronidase angeboten werden. Die Reinheit der Substanzen gewährt einen von unerwünschten Nebenreaktionen weitgehend freien Reaktionsablauf.

DUTTON (13) empfiehlt zur Glucuronidspaltung die Verwendung gereinigter β -Glucuronidase aus Vorhofdrüsen weiblicher Ratten bei pH 4,5 - 5. Hier wurde mit bakterieller β -Glucuronidase aus *E. coli* bei pH 7,0 gearbeitet, was sich in keiner Beziehung als nachteilig erwies. Die Aktivität des Präparats wird vom Hersteller (Fa. SERVA, Heidelberg) mit 60.000 Fishman-Einheiten/g angegeben. Durch Zusatz von einem Tropfen CHCl_3 auf 100 ml β -Glucuronidase-Lösung soll sich die Aktivität des Enzyms gegenüber bestimmten Substraten auf 160.000 E/g steigern lassen.

Mit β -MUBF als Substrat führte die Behandlung der β -Glucuronidase mit CHCl_3 nicht zu einer Aktivitäts- bzw. Umsatzsteigerung. Als optimal für die Hydrolyse von β -MUBF-Glucuronid erwies sich eine Enzym-Menge von 0,2 ml einer β -Glucuronidase-Stammlösung von 0,6 mg/ml pro Ansatz (0,8 ml). Diese Stammlösung ist bei -23°C gefroren mehrere Tage ohne Aktivitätsverlust haltbar.

Als pH-Optimum für die durch bakt. β -Glucuronidase katalysierte Reaktion bestätigte sich pH 7,0. Die günstigste Konzentration des verwendeten Tris-HCl-Puffergemisches (pH 7,0) war dabei 50 mM im Test.

Die Inkubationszeit bei 37°C für einen vollständigen Umsatz von Glucuronid-Mengen des hier gewählten Meßbereichs geht aus der Zeit-Umsatz-Kurve (Abb. 14) hervor. Nach 20 min sind 98 % des vorgegebenen Substrats hydrolysiert, die Kurve verläuft dann praktisch parallel zur Abszisse. Ein Zerfall von freigesetztem MUBF setzt auch nach längerer Inkubation nicht ein. Bei den UDPGA-Bestimmungen wurde für die β -Glucuronidase-Reaktion eine Inkubationszeit von 40 min eingehalten.

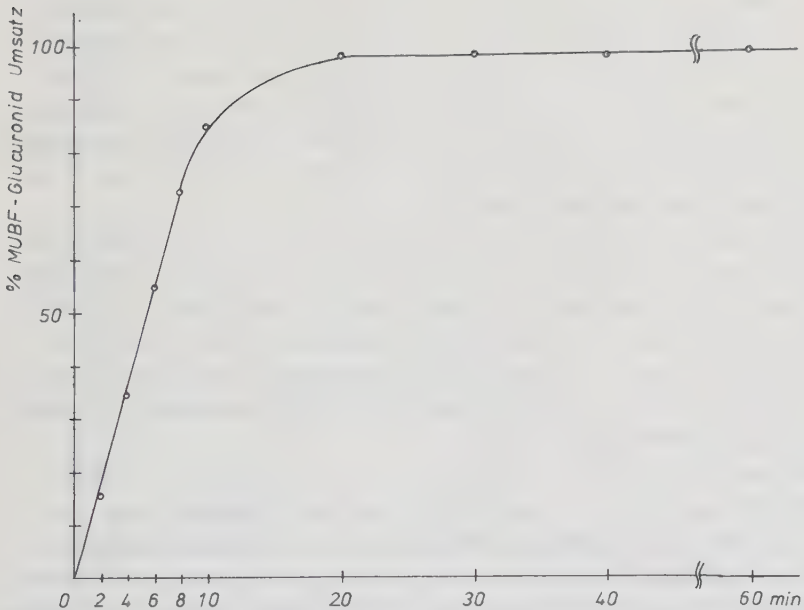


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von MUBF-Glucuronid durch β -Glucuronidase. (Zeit-Umsatz-Kurve "MUGA")

Ansätze: 50 μ Mol Tris-HCl-Puffer (pH 7,0), 4,7 μ Mol MUBF-Glucuronid, 0,12 mg β -Glucuronidase. Gesamtvolumen: 0,8 ml. Inkubation: 2 - 60 min bei 37°C. Danach mit 3,2 ml Glycin-Puffer pH 10,3 aufgefüllt und Fluoreszenz gemessen. Endvolumen: 4 ml.

Nach Inkubation der β -Glucuronidase-Ansätze müssen diese alkalisiert werden, damit das freigesetzte MUBF fluorometrisch gemessen werden kann. Dazu eignet sich Glycin-NaOH-Puffer. Die Ansätze wurden jeweils mit 3,2 ml 0,1 M Glycin-Puffer pH 10,35 aufgefüllt (Endvol. = 4 ml). Puffer-Konzentration und pH-Wert erwiesen sich so eingestellt als am günstigsten für die Fluoreszenzentwicklung. Die Fluoreszenz bleibt dabei mehr als 12 Std. stabil, wenn die Ansätze im dunkeln aufbewahrt werden. Die Einwirkung von UV-Licht führt zur Abnahme der Fluoreszenz. Um hierdurch auftretende Fehler zu vermeiden, wurde bei jeder Bestimmung die Fluoreszenz innerhalb von 5 min nach Zusatz des Puffers gemessen.

Unter den für die enzymatische Hydrolyse von β -MUBF-Glucuronid gewählten Bedingungen verläuft die Freisetzung von MUBF über den ganzen Meßbereich hinweg proportional zur Glucuronid-Menge. Dieses geht aus dem streng linearen Verlauf der Funktion in Abbildung 15 hervor. Eine ebensolche Beziehung erhält man durch Erstellung einer Eichkurve mit entsprechenden Mengen an reinem β -MUBF (Abb. 16).

Entscheidend für die quantitative Richtigkeit der UDPGA-Bestimmungsmethode ist weiterhin, daß nach Ausschütteln der Ansätze das vorliegende β -MUBF-Glucuronid vollständig hydrolysiert wird. Daß dieses der Fall ist, kann durch verschiedene Versuchsanordnungen nachgewiesen werden. Dazu wurde ein β -MUBF-Glucuronid enthaltender Ansatz mit β -Glucuronidase inkubiert, mit Glycin-Puffer aufgefüllt und die Fluoreszenz gemessen. Ein Teil desselben Ansatzes wurde nach Inkubation mit CHCl_3 ausgeschüttelt und einer zweiten Inkubation mit β -Glucuronidase unterzogen und gemessen. Es zeigte sich, daß durch Reinkubation keine weitere MUBF-Freisetzung auftrat.

In einem zweiten Versuch wurde der MUGA-Umsatz durch β -Glucuronidase bestimmt. Es wurden mehrere Ansätze zur Glucuronid-Synthese mit MUBF in ansteigender Konzentration, UDPGA-Überschuß, Tris-Puffer und Mikrosomen inkubiert. Daneben wurde ein zweites System von Ansätzen mit denselben Reagenzien inkubiert, welche jedoch anstatt UDPGA gleiche Volumina Aqua dest. ent-

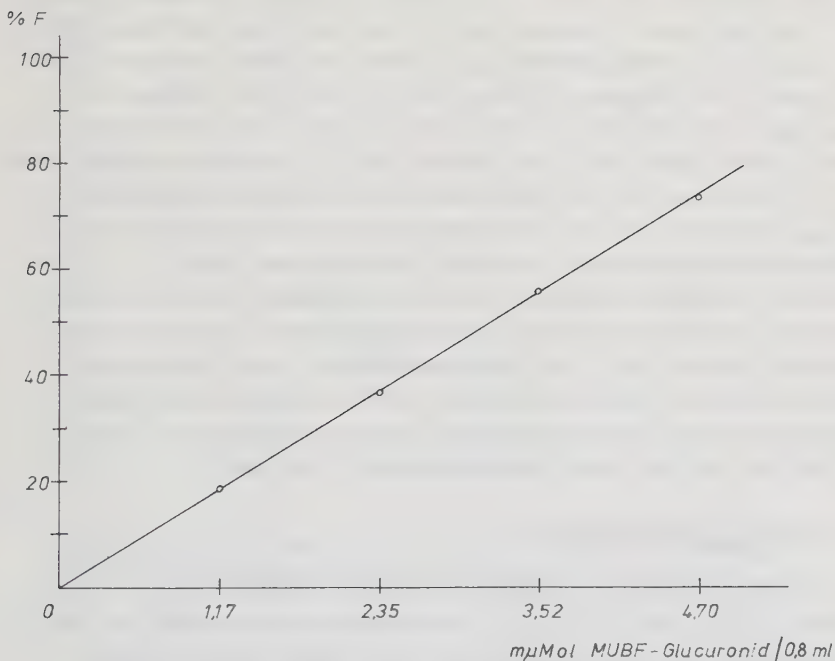


Abb. 15: Freisetzung von β -Methylumbelliferon aus MUBF-Glucuronid durch enzymat. Hydrolyse.

Ansätze: 50 μMol Tris-HCl-Puffer (pH 7,0),
1,17 - 4,70 μMol MUBF-Glucuronid,
0,12 mg β -Glucuronidase
Gesamtvol.: 0,8 ml, inkubiert 45 min bei 37°C,
mit 3,2 ml Glycinpuffer (pH 10,3) aufgefüllt
und Fluoreszenz des freigesetzten MUBF ge-
messen (%F).

hielten. Nach 15 min Inkubation wurde zentrifugiert, von jedem Ansatz 0,2 ml des Überstandes mit Glycin-Puffer aufgefüllt und die Fluoreszenz gemessen. Dabei zeigten die Ansätze mit Aqua dest. die je nach MUBF-Konzentration zu erwartende Fluoreszenz. Bei den Ansätzen mit UDPGA-Überschuß hingegen war die Fluoreszenz vollständig gelöscht, da alles MUBF glucuronidiert worden war. Zur weiteren Untersuchung wurden von allen Ansätzen nochmals 0,2 ml des Überstandes mit β -Glucuronidase inkubiert, alkalisiert und gemessen. Es ergaben sich bei den Proben mit Aqua dest. Werte, die mit denen der ersten Messung im Mittel gleich waren. Auch bei den Ansätzen mit Glucuronidsynthese trat nun Fluoreszenz auf und zwar analog zu den Werten der UDPGA-freien Gruppe abgestuft nach MUBF-Konzentration der Ansätze. Rechnerisch ergab sich ein Hydrolyse-Grad von 98 %.

Diese Untersuchungen waren auch notwendig, um auszuschließen, daß während der Anfangsinkubation andere Konjugate von MUBF gebildet würden, die die Wiederherstellung der Fluoreszenz durch Hydrolyse stören könnten. Tatsächlich sind diese Parasitenreaktionen in diesem System, wenn sie überhaupt ablaufen, so gering, daß sie nicht augenscheinlich werden.

9. Fluoreszenzphotometrie:

Die Fluoreszenz von β -MUBF wurde mit UV-Licht von 365 nm angeregt, die Intensität der Sekundärstrahlung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen, gegen eine Chininstandard-Lösung von 4 μ g Chininsulfat/ml 0,1 n H_2SO_4 . Mit Hilfe des Standards wurde bei jeder Messung das Fluorometer auf 50 % Transmission eingestellt. Dabei entsprach die Fluoreszenz der Chininlösung der von 0,875 μ Mol MUBF/ml 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer, pH 10,35. Die MUBF-Fluoreszenz muß sofort abgelesen werden, da sie unter der Einwirkung des UV-Lichts schnell abfällt.

Wie die Eichkurve (Abb. 16) zeigt, besteht ein lineares Verhältnis zwischen der Konzentration und der Fluoreszenz von MUBF über den gesamten Meßbereich von 0 - 1,6 μ Mol MUBF/ml. Ebenso besteht direkte Proportionalität bei der UDPGA-Bestimmung zwischen der UDPGA-Menge/Ansatz und der gemessenen MUBF-Fluoreszenz (Abb. 17).

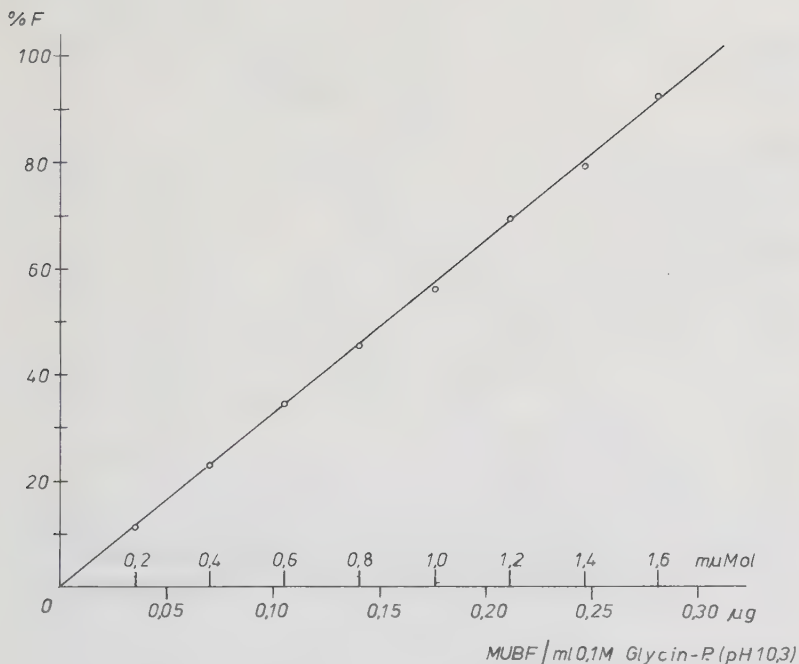


Abb. 16: Eichkurve zur fluorometrischen Bestimmung von 6-Methylumbelliferon (MUBF).

Ansätze: 0,8 - 6,4 μMol MUBF in 4 ml 0,1 M Glycin-NaOH-Puffergemisch pH = 10,35.

Fluoreszenzmessung: in OS-Küvetten d = 1cm

Primärstrahlung = 365 nm

Sekundärstrahlung = 450 nm

Spalt 0,30

Werte sofort abgelesen gegen Chininstandard
(4 μg Chininsulfat/ml 0,1 N H_2SO_4) = 50 %F.

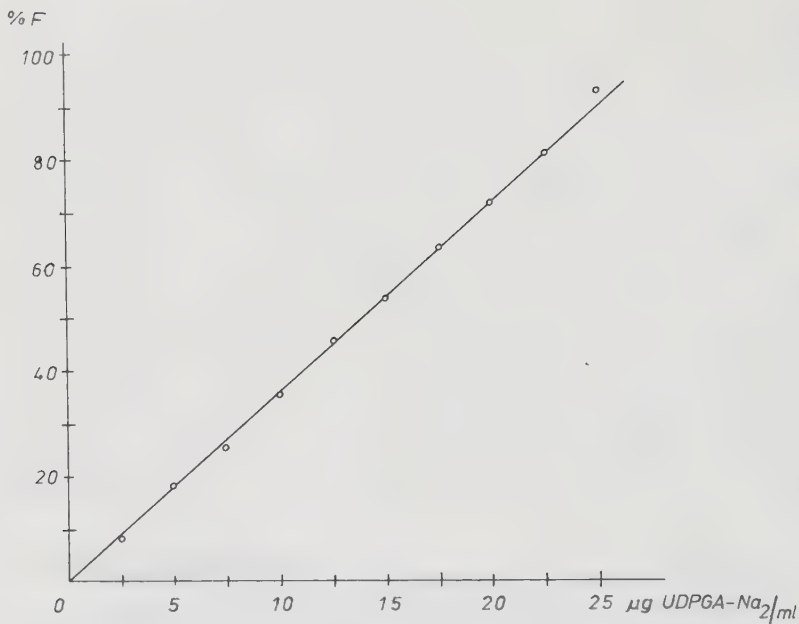


Abb. 17: UDPGA-Bestimmung mit UDPGA-Na₂-Testlösung
in steigender Konzentration mit der hier
ausgearbeiteten Methode.

Ansätze mit 2,5 - 25 µg UDPGA-Na₂ (78 %ig an UDPGA)
wurden in der auf Seite 43 (UDPGA-Bestimmung - Über-
sicht) beschriebenen Weise behandelt und die Fluoreszenz-
werte dem jeweiligen UDPGA-Na₂- Gehalt /ml Ansatz im
Diagramm zugeordnet.

10. UDPGA-Bestimmung - Übersicht:

Aus den in den Abschnitten 1.-9. mitgeteilten Versuchen ergibt sich für das UDPGA-Bestimmungsverfahren folgende Arbeitsvorschrift:

Reagenzien-Mix: Tris-HCl-Puffer 0,15 M, pH 7,6 10 Vol.
MgCl₂-Lösung 0,1 M 1 Vol.
β-MUBF-Lösung 1,0 mM 4 Vol.

In Plastikröhrchen pipettieren:		Konzentr. im Test bei Inkubation
Reagenzien-Mix	0,75 ml	75 mM Tris-Puffer 5 mM MgCl ₂ 0,2 mM B-MUBF
Probe	0,20 ml	
Mikrosomen + 0,4 % Triton	0,05 ml	
mischen, im Schüttelthermostat 15 min bei 37°C inkubieren, dann auffüllen mit:		
Chloroform	7,0 ml	
Röhrchen gut verschließen und 1 min im Ausschüttelapparat bewegen, 3 min stehenlassen, nach Abtrennung der wässrigen Phase Chloroform absaugen und nochmals ausschütteln mit:		
Chloroform	7,0 ml	
dann 5 min bei 2000 x g zentrifugieren. In neue Plastikröhrchen pipettieren:		
Überstand (wässrige Phase)	0,2 ml	50 mM
Tris-HCl-Puffer 0,1 M, pH 7,0	0,4 ml	
β-Glucuronidaselös. (0,6mg/ml)	0,2 ml	
mischen, im Schüttelthermostat 40 min bei 37°C inkubieren, dann auffüllen mit:		
Glycin-Puffer 0,1 M, pH 10,35	3,2 ml	80 mM
Fluoreszenzstrahlung innerhalb von 5 min messen gegen Chinistandard.		

UDPGA-Berechnung:

a) mit Hilfe der Eichkurve (Abb. 16):

Der Fluoreszenzwert wird um den Leerwert korrigiert, und die freigesetzten μg MUBF/ml werden der Eichkurve entnommen, dann ist:

$$\mu\text{g MUBF/ml} \cdot 4 \cdot 5 \cdot 5 \cdot \frac{580,3}{176,17} = \mu\text{g UDPGA/ml Probe}$$

$$\mu\text{g MUBF/ml} \cdot 329,39 = \mu\text{g UDPGA/ml Probe}$$

oder:

$$\mu\text{g MUBF/ml} \cdot 4 \cdot 5 \cdot 5 \cdot \frac{10^3}{176,17} = \mu\text{Mol UDPGA/ml Probe}$$

$$\mu\text{g MUBF/ml} \cdot 567,63 = \mu\text{Mol UDPGA/ml Probe}$$

b) mit Hilfe des Chininstandards:

Das Fluoreszenzphotometer wird vor jeder Messung mit der Chinisstandardlösung ($4 \mu\text{g}$ Chininsulfat/ml $0,1 \text{ n H}_2\text{SO}_4$) auf 50 % Transmission eingestellt, das entsprach hier der Fluoreszenzintensität von $0,154 \mu\text{g}$ MUBF/ml. Daraus läßt sich ableiten:

$$\frac{(P - BP) \cdot 0,154}{\text{ChST}} = \mu\text{g MUBF/ml}$$

$$\frac{(P - BP) \cdot 0,154}{\text{ChST}} \cdot 567,63 = \mu\text{Mol UDPGA/ml Probe}$$

$$(P - BP) \cdot 1,7483 = \mu\text{Mol UDPGA/ ml Probe}$$

P = Fluoreszenzintensität der Probe

BP = " " der Blindprobe (Leerwert)

ChST = " " der Chininstandardlösung,
konstant eingestellt auf 50 % der Skala.

11. Aufbereitung von biologischem Material:

a) Homogenate

TAKETA (65) unterscheidet zwischen einer direkten und indirekten UDPGA-Bestimmung. Beim direkten Verfahren verwendet er 2,5 %iges Leberhomogenat als Analysenprobe und berechnet den UDPGA-Gehalt aus der Menge an "endogen" gebildetem MUBF-Glucuronid. Diese Methode hält TAKETA dann für befriedigend, wenn nur geringe Mengen an Lebergewebe zur Verfügung stehen, wie es bei den durch Nadelbiopsie gewonnenen Proben menschlicher Leber der Fall ist; er weist jedoch auch darauf hin, daß die Methode ungenau wird, wenn die Homogenate in bezug auf die GT-Aktivität hohe UDPGA-Konzentrationen aufweisen. Außerdem bleibt fraglich, in welchem Ausmaß UDPGA im Homogenat vor und während der Inkubation zerfällt.

Um zu klären, ob sich Homogenate zur UDPGA-Bestimmung eignen, mußte zunächst einmal das tatsächliche Ausmaß des UDPGA-Zerfalls im Homogenat bestimmt werden und zwar unter Bedingungen, welche für Laboruntersuchungen immer dann gewählt werden, wenn solche Zerfalls- oder Nebenreaktionen unterdrückt bzw. ausgeschlossen werden sollen. Dazu wurde die gesamte Leber einer Ratte portionsweise in 0,15 M KCl-Lösung homogenisiert und das Homogenat in einem im Eisbad stehenden Glas gesammelt. Dabei kam es darauf an, daß der Homogenisiervorgang so kurz wie möglich gehalten wurde und die Temperatur des Homogenats zwischen 0 und 1°C konstant eingehalten wurde. Dem Kühlgefäß wurde dann in Zeitabständen von 5 min Homogenat entnommen, welches sofort zur Kochsaftgewinnung in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml), das im Glyzerinbad bereits auf 100°C erhitzt worden war, pipettiert wurde. Nach 3 min Hitzeeinwirkung wurde der Kochsaft abzentrifugiert und zur UDPGA-Bestimmung inkubiert.

Wie das Diagramm der Abbildung 18 zeigt, setzt der UDPGA-Zerfall im eisgekühlten Homogenat praktisch sofort mit großer Anfangsgeschwindigkeit ein und verläuft dann langsamer, nachdem fast 50 % an UDPGA abgebaut sind. Dieses ist nach 15 min bereits der Fall. Nach 60 min können nur noch 16 % der

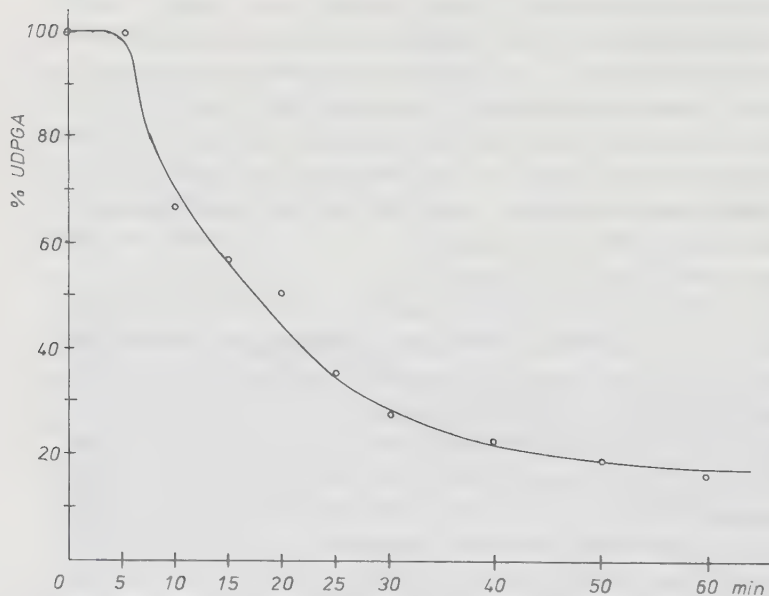


Abb. 18: Zerfall der Uridindiphosphoglucuronsäure (UDPGA) im eisgekühlten Rattenleberhomogenat.

Von einem 50 %igen, eisgekühlten Rattenleberhomogenat wurden nach 0, 5, 10 usw. min Proben entnommen, zu Kochsaft weiterverarbeitet und zur UDPGA-Bestimmung inkubiert.

Der UDPGA-Gehalt des Homogenats zur Zeit t ist in % der Zeit-Null-Probe auf der Ordinate abgetragen.

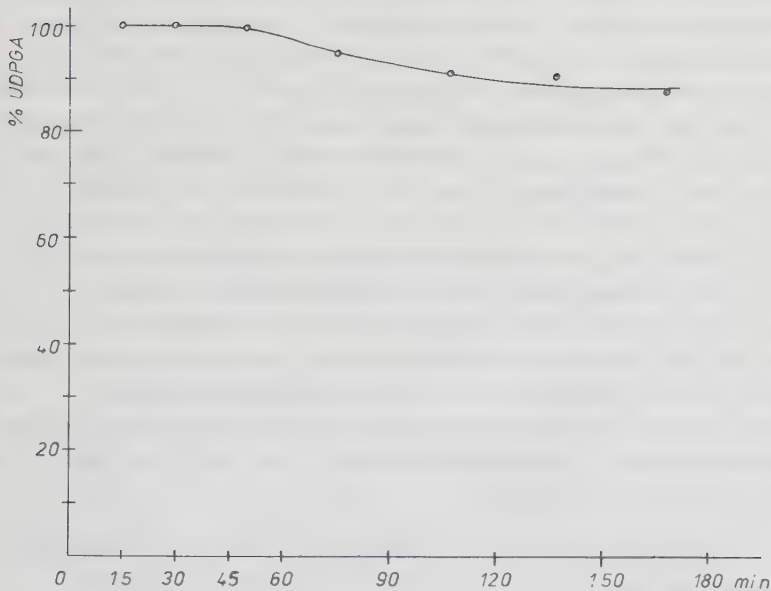


Abb. 19: Zerfall der Uridindiphosphoglucuronsäure (UDPGA) in eisgekühltem Lebergewebe.

Die Leber einer Ratte wurde nach Präparation im Kühlgefäß bei 1 - 2°C aufbewahrt. In Zeitabständen von etwa 30 min wurden Proben entnommen, homogenisiert, zu Organkochsaft aufbereitet und der UDPGA-Gehalt der gekochten Gewebsextrakte bestimmt.

Der UDPGA-Gehalt der Leber zur Zeit t ist in % der nach 15 min entnommenen Probe auf der Ordinate abgetragen.

Zur Zeit Null wurde das Tier getötet und mit der Präparation der Leber begonnen.

im Homogenat vorhandenen UDPGA-Menge nachgewiesen werden. Der schnelle Nucleotid-Abbau ist nur eine Reaktion von vielen, die sich im Homogenat selbst unter eiskalten Bedingungen abspielen. Bei dieser Art der Gewebsaufbereitung vermischen sich plötzlich sonst streng getrennte Enzym-Komplexe des Zytoplasmas und des extrazellulären Raumes, sodaß ein unübersehbarer Chemismus einsetzt. Berücksichtigt man, daß sich die Enzym-Aktivitäten bei einer Temperatursteigerung von 10°C etwa verdoppeln, so ist mit einem noch rapideren UDPGA-Zerfall zu rechnen, wenn das Homogenat auf Zimmertemperatur erwärmt oder gar einer Inkubationstemperatur von 37°C ausgesetzt wird. Es erscheint unter diesen Bedingungen sehr fraglich, ob sich mit einfachem Homogenat als Untersuchungsmaterial überhaupt eine quantitativ richtige UDPGA-Bestimmung durchführen läßt.

Umschendlich und quantitativ schwieriger handhabbar ist die Herstellung gekochter Gewebsextrakte. Durch diese Art der Gewebsaufbereitung gewinnt man jedoch ein Untersuchungsmaterial, in welchem die ursprüngliche UDPGA-Konzentration des Homogenats fixiert ist und über längere Zeit auch bei Zimmertemperatur unverändert bleibt.

Im Zusammenhang mit der Zerfallsbestimmung von UDPGA war auch von Interesse, wie sich UDPGA in der gekühlten Leber nach Entnahme des Organs verhält. Dazu wurde eine Rattenleber sofort nach Präparation mit eiskalter KCl-Lösung abgespült, auf Filterpapier getrocknet und in einem Kühlgefäß bei $1 - 2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Von dieser Leber wurden dann in Zeitabständen von etwa 30 min Proben von je 1 g zur Kochsafftherstellung genommen. Die UDPGA-Konzentration der gekochten Gewebsextrakte wurde bestimmt und gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 19).

Der Verlauf der Kurve zeigt, daß in den ersten 45 min nach Tötung des Tieres der UDPGA-Gehalt der gekühlten Leber nicht verändert wird. Dann setzt langsam eine Abnahme ein mit 2 % UDPGA-Verlust nach 1 Std. und etwa 9 % nach 2 Std.. Nach fast 3 Std. können noch 88,5 % der ursprünglich vorhandenen UDPGA-Menge nachgewiesen werden.

b) Organkochsaft

Die oben beschriebenen Unsicherheitsfaktoren bei der UDPGA-Bestimmung in Homogenaten können durch die Verwendung von Organkochsaft als Untersuchungsmaterial weitgehend ausgeschaltet werden. Diese Tatsache rechtfertigt die technisch und zeitlich aufwendigere Herstellung von gekochten Gewebsextrakten. Durch das Aufkochen von Gewebe oder Gewebshomogenat erreicht man eine schnelle Denaturierung des störenden Proteins auf physikalischem Wege, und man erhält so einen Überstand, der frei ist von Parasitenreaktionen, die auf die Konzentration des thermostabilen Nucleotids UDPGA nachträglich Einfluß nehmen könnten.

DUTTON (13) verwendet zur Kochsaftgewinnung frisches, eiskühles Gewebe. Drei Gramm davon werden in etwa 1 cm^3 große Würfel geschnitten und sofort in kochendes Wasser (6 ml) gegeben. Nach 3 min Kochen wird die Mischung abgekühlt und bei $2000\cdot g$ 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand ist der Organkochsaft. Bei diesem Verfahren muß der Wasserverlust durch Wiegen vor und nach dem Kochen bestimmt und ausgeglichen werden, wenn man die UDPGA-Konzentration des Kochsaftes quantitativ richtig auf die Gewebsmenge beziehen will. Außerdem lassen sich die gekochten Gewebswürfel nur schwer homogenisieren, und oft zeigen die Kochsäfte Trübungen, die sich durch Zentrifugieren nicht beseitigen lassen. Eine zweite Möglichkeit zur Herstellung gekochter Gewebsextrakte besteht darin, daß man zuerst das Gewebe homogenisiert und dann das Homogenat aufkocht. Dieses Verfahren bringt bei Beachtung bestimmter technischer Gesichtspunkte bessere Resultate und ist ersterem überlegen. Dazu wurde folgende Verfahrensweise ausgearbeitet:

Eiskühles Gewebe wird im Glashomogenisator (5 ml-Gefäß) nach Potter-Elvehjem mit Teflonstempel maschinell mit 600 Upm nicht länger als 20 sec unter ständiger Eiskühlung homogenisiert. Dabei wird dem Gewebe soviel eiskalte $0,154\text{ M}$ KCl-Lösung zugesetzt, daß 1 ml Homogenat $0,5\text{ g}$ Gewebe entspricht. Nach dem Homogenisieren werden $0,5\text{ ml}$ des Homogenats für spätere Untersuchungen (GT-Aktivität, Protein, DNA) ent-

nommen und eingefroren. Dann wird das restliche Homogenat (ca. 4 ml) sofort in ein Zentrifugenglas aus Duran^R 50 (Fa. Schott, Mainz) gegeben. Dieses Zentrifugenglas stellt man schon vor dem Homogenisieren in ein zur Hälfte mit Wasser gefülltes Becherglas (150 ml) und bringt das Wasser zum Kochen. Das Homogenat wird so schon beim Einfüllen in das vorerhitzte Glas innerhalb von Sekunden denaturiert. Nach 4 min wird das Zentrifugenglas aus dem siedenden Wasser genommen, unter fließendem Leitungswasser schnell abgekühlt, verstöpselt und im Eisbad auf 0 - 1° C gebracht. Danach wird 30 min lang bei 2000-g in der Kühlzentrifuge geschleudert. Man erhält einen klaren, serumfarbenen Überstand, den Organ- kochsaft. Dieser ist nach dem Zentrifugieren sofort ab zu pipettieren, da sich die zusammengepreßten Gewebsanteile des koagulierten Homogenats im Glas wieder ausdehnen und den Koch- saft aufnehmen.

Bei dieser Anordnung gewinnt man aus 5 ml Homogenat etwa 1,5 - 2 ml Organkochsaft, wobei 1 ml Überstand 0,5 g Gewebe entspricht. Der Gewichtsverlust durch das Kochen beträgt dabei nicht mehr als 2 %, da der vom Homogenat abgegebene Wasserdampf sich größtenteils am kühleren Hals des Zentri- fugenglases niederschlägt und so wieder ins Homogenat zurück- gelangt. Ein UDPGA-Verlust konnte in Versuchen mit reiner UDPGA-Na₂-Lösung (4 min gekocht) sowie in Zusatzversuchen nicht festgestellt werden.

Stehen nur kleine Gewebsmengen zur Verfügung (bis 500mg), so kann man das Homogenat stärker verdünnen, damit eine aus- reichende Kochsaftmenge entsteht. Um aber in jedem Fall gut ablesbare Fluoreszenzwerte zu erhalten, wurde durch Verän- derung der Geräteanordnung das Verfahren zur Gewinnung von Organkochsaft für kleine Homogenatvolumina praktikabel ge- macht:

Das Gewebe wird wie oben beschrieben homogenisiert und das Homogenat (ca. 1 ml) sofort in ein Reaktionsgefäß aus Plastik (Fa. Eppendorf, Marburg) gegeben, welches in einem auf 105° C erhitzten Glycerinbad hängt. Dieses ist notwendig, damit im Homogenat auch tatsächlich Temperaturen um den

Siedepunkt erreicht werden (Bläschenbildung), da sich sonst kein Kochsaft gewinnen läßt. Nach 3 min wird das Reaktionsgefäß aus dem Glycerinbad genommen, verschlossen und im Eisbad abgekühlt. Dann wird 30 min bei 2000·g zentrifugiert. Man erhält etwa 0,3 - 0,4 ml Überstand.

Um den Einfluß der Konzentration des zur Kochsaftgewinnung verwendeten Homogenats auf die UDPGA-Bestimmung zu ermitteln, wurden Leberhomogenate von 10 - 50 % (g/v) hergestellt und wie oben beschrieben aufbereitet. Die gekochten Gewebsextrakte wurden dann zur UDPGA-Bestimmung inkubiert. Es zeigte sich ein zur Konzentration der Ausgangshomogenate linear proportionaler Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 20). Es ist demnach möglich, je nach UDPGA-Gehalt und Menge der zur Verfügung stehenden Gewebe die günstigste Homogenatkonzentration zwischen 10 und 50 % zu wählen.

Ebenso wurde geprüft, wie sich verschiedene Probevolumina im Inkubationssystem zur UDPGA-Bestimmung auswirken. Dazu wurde Leberkochsaft in ansteigender Menge von 0,04 - 0,2 ml den Bestimmungsansätzen zugesetzt. Auch hier zeigte sich ein linear proportionaler Anstieg der Fluoreszenz in bezug auf das Volumen der Analysenprobe. Bei Kochsäften von UDPGA-reichen Geweben (z.B. Meerschweinchenleber) empfiehlt es sich deshalb, weniger als 0,2 ml Probe zu inkubieren, damit die Fluoreszenzwerte im Meßbereich liegen (Eichkurve, Abb. 16).

Die nach eigenem Verfahren hergestellten Organkochsäfte gelangten entweder sofort zur UDPGA-Bestimmung, oder sie wurden eingefroren. Bei -23°C gelagert sind die gekochten Gewebsextrakte wochenlang ohne UDPGA-Verlust haltbar. Bei Zimmertemperatur nimmt die UDPGA-Konzentration in 24 Std. etwa um 20 % ab.

Zum Vergleich der beiden Verfahren zur Kochsaftgewinnung wurden von 6 Rattenlebern jeweils Extrakte durch Kochen von Gewebswürfeln und von Homogenat hergestellt und UDPGA bestimmt. Dabei lagen die UDPGA-Werte der aus Homogenat ge-

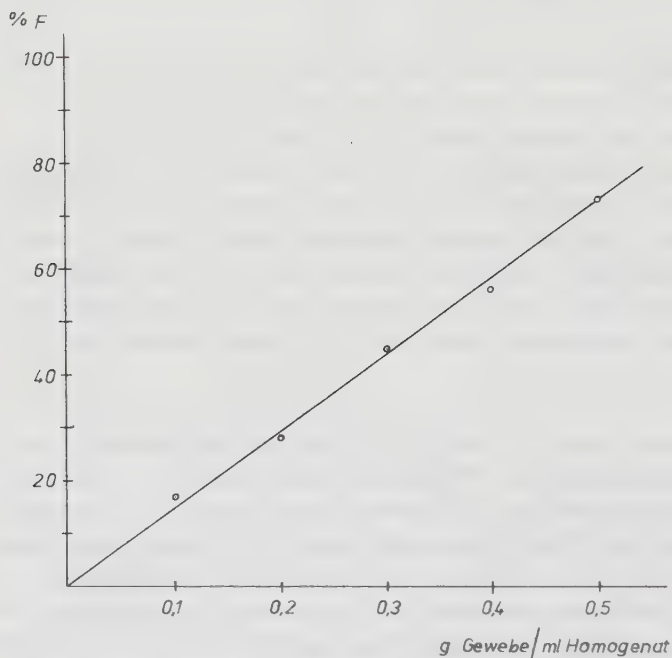


Abb. 20: Einfluß der Konzentration des zur Kochsaftgewinnung verwendeten Homogenats auf die UDPGA-Bestimmung.

Leberhomogenate von 10 -50 % (g/v) wurden zu Organkochsaft aufbereitet und der UDPGA-Gehalt bestimmt. Der dem UDPGA-Gehalt der Proben proportionale Fluoreszenzwert (%F) ist im Diagramm gegen die Homogenatkonzentration abgetragen.

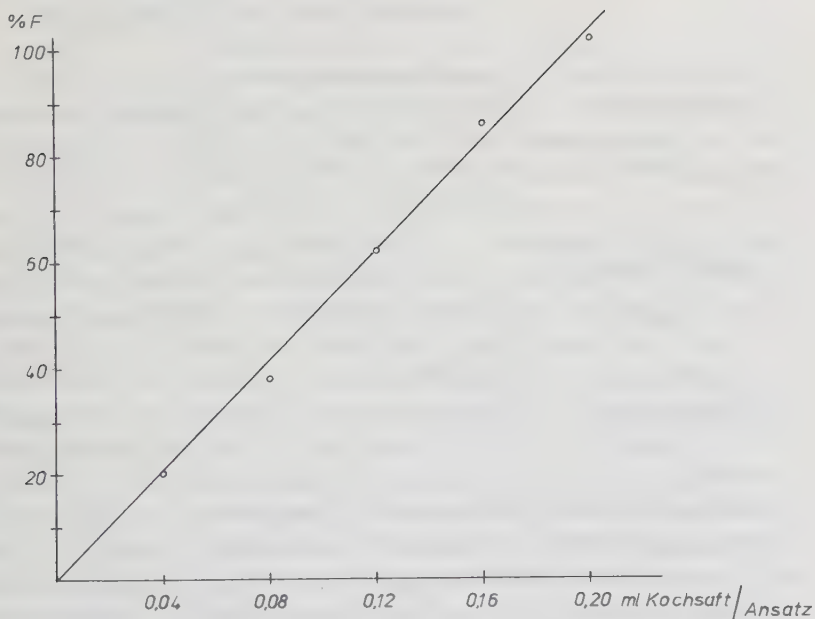


Abb. 21: UDPGA-Bestimmung mit ansteigender Organ-
kochsaftkonzentration im Test.

Die Ansätze enthielten Leberkochsaft in ansteigender Menge von 0,04 - 0,20 ml. Zur UDPGA-Bestimmung wurde verfahren wie auf Seite 43 beschrieben.

Der dem UDPGA-Gehalt der Ansätze proportionale Fluoreszenzwert (%F) ist im Diagramm gegen die Kochsaftkonzentration abgetragen.

Tab. 3: Vergleich der beiden Aufbereitungs-
verfahren zur Organkochsaftgewinnung.

Rattenleber	Aufbereitung nach	
	A	B
$\mu\text{Mol UDPGA}$ pro 100 g (Feuchtgew.)	5,4	6,0
	5,6	5,9
	7,7	7,9
	13,6	14,3
	9,8	11,0
	11,0	11,5
Mittelwert ($\bar{x}$)	8,85	9,43
Stand.-Abw. (s_x)	3,22	3,37

Von 6 Rattenlebern wurden jeweils hergestellt für
Reihe A : Extrakte durch Kochen von Gewebswürfeln,
 B : Extrakte durch Kochen von Homogenat.

Der UDPGA-Gehalt der so gewonnenen Kochsäfte wurde
bestimmt und auf 100 g Feuchtgewicht bezogen.

Auswertung: Im t-Test für verbundene Stichproben er-
wies sich die Mittelwertsdifferenz zwischen Reihe A
und B als signifikant ($t = 4,048$, $N = 6$) bei einer
Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 1\%$.

wonnenen Kochsäfte im Mittel um 6,5 % über den Werten der Extrakte, die nach dem von Dutton (13) beschriebenen Verfahren hergestellt worden waren (Tab. 3).

12. Wiederfindung von zugesetzter Uridindiphosphatglucuronsäure aus biologischem Material:

Für die Wiederfindungsversuche wurden dem biologischen Material bekannte Mengen UDPGA zugesetzt. Soweit es sich hier um die Untersuchung von gekochten Gewebsextrakten handelte, konnte UDPGA nicht einfach den Kochsäften beigegeben werden, sondern der Prozeß der Kochsaftgewinnung mußte in die UDPGA-Wiederfindungsversuche mit eingeschlossen werden. Es wurden zunächst wäßrige Lösungen von UDPGA mit verschiedener Konzentration angesetzt. Von diesen Lösungen wurden dann aliquote Teile in Zentrifugengläser pipettiert und diese dann ins siedende Wasserbad gestellt. Danach wurde Homogenat von Leber- oder Nierengebebe in die erhitzten Gläser gegeben und weiter verfahren wie unter "Organkochsaft" (Punkt 11.b) beschrieben. In den so gewonnenen Kochsäften wurde dann der UDPGA-Gehalt bestimmt (s.S. 43) und nach Abzug der Blindprobe die wiedergefundene Menge an UDPGA berechnet. Die Ergebnisse der Wiederfindung von UDPGA aus Kochsaft von Rattenleber und Rattenniere sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengestellt.

Da das für die Wiederfindungsversuche verwendete UDPGA-Präparat (Fa. Boehringer, Mannheim) UDPGA nicht als Reinstoff sondern als di-Natriumsalz enthielt, waren zusätzliche Kontrollen der Testlösung notwendig. Als typische Analyse des Präparats wird vom Hersteller 78% UDPGA, 8% Na und 10% H₂O angegeben. Der tatsächliche UDPGA-Gehalt einer Testlösung läßt sich in etwa durch die Messung der Absorption bei 260 nm (pH 7,0) bestimmen. Der Extinktionskoeffizient beträgt dabei 9,9 cm²/μMol. Da jedoch Uracil die einzige UV-absorbierende Gruppe des UDPGA-Moleküls ist, läßt sich durch die Absorptionsmessung bei 260 nm im Prinzip nur der Gehalt der Lösung an Uracil-Basen bestimmen; daß eine äquimolare Menge UDPGA vorliegt, kann dabei nur angenommen werden.

Tab. 4: Wiederfindung von zugesetzter UDPGA
aus biologischem Material.

Biolog. Material	Leberhomogenat 50 %ig (g/v), zu Orfankochsaft aufbereitet		
UDPGA-Na ₂ -Testlö- sung mg/ml	0,4	0,8	1,2
UDPGA-Gehalt (E _{260 nm})	0,070	0,142	0,213
Zugesetzte Menge UDPGA µg/Ansatz	5,75	11,66	17,50
Wiedergefundene Menge UDPGA µg/Ansatz	5,59	9,92	16,97
	6,22	11,70	16,21
	5,96	11,43	17,75
	5,85	11,56	17,60
	5,46	10,93	16,97
	5,46	11,56	17,48
	5,85	11,43	17,25
	5,21	11,70	17,25
	5,72	11,56	16,35
	5,34	11,20	17,60
Mittelwert ($\bar{x}$)	5,66	11,29	17,14
Wiedergefunden (Mittel)	98,5 %	96,2 %	97,9 %
Stand.-Abw. (s_x)	0,310	0,538	0,525
Variationskoeff.	5,47 %	4,76 %	3,06 %

Tab. 5: Wiederfindung von zugesetzter UDPGA
aus biologischem Material.

Biolog. Material	Nierenhomogenat 50 %ig (g/v), zu Kochsaft aufbereitet		
UDPGA-Na ₂ -Testlö- sung mg/ml	0,2	1,0	2,0
UDPGA-Gehalt (E ₂₆₀)	0,019	0,094	0,189
Zugesetzte Menge UDPGA µg/Ansatz	1,56	7,62	15,51
Wiedergefundene Menge UDPGA µg/Ansatz	1,47	7,30	15,59
	1,45	7,30	14,81
	1,54	7,76	15,15
	1,59	7,44	16,99
	1,57	7,56	14,98
	1,52	7,36	13,85
	1,57	7,44	14,81
	1,50	7,80	14,90
Mittelwert ($\bar{x}$)	1,52	7,49	15,14
Wiedergefunden (Mittel)	97,5 %	98,4 %	97,6 %
Stand.-Abw. (s_x)	0,05	0,19	0,89
Variationskoeffizient	3,28 %	2,53 %	5,87 %

13. Untersuchung menschlicher Proben:

Mit der hier ausgearbeiteten Methode zur UDPGA-Bestimmung wurden etwa 50 normale sowie pathologische Seren untersucht. Serumproben, die ohne Vorbehandlung zum enzymatischen Test eingesetzt wurden, erbrachten Fluoreszenzwerte, die sich überhaupt nicht von den Leerwerten unterschieden, bzw. sich im Bereich der unteren Nachweisgrenze der Methode bewegten, sodaß eine gesicherte Aussage über UDPGA-Konzentrationen im Serum nicht möglich war.

Eine relative Empfindlichkeitssteigerung der Methode ist durch die Verwendung eines stärker verdünnten Chininstandards ($0,1 \mu\text{g}$ Chininsulfat/ml $0,1 \text{ n H}_2\text{SO}_4$) möglich, wobei das Fluoreszenzphotometer mit entsprechend höherer Verstärkung betrieben werden muß. Dabei wird jedoch die Fluoreszenzintensität der Blindprobe in gleichem Maße gesteigert wie die der Analysenprobe, sodaß auch diese Maßnahmen nicht zu brauchbaren Resultaten bei der Serumuntersuchung führen.

Um auszuschließen, daß der Proteingehalt des Serums Löscheffekte bei der fluorometrischen Messung erzeugt, wurden die Seren mit verschiedenen Enteiweißungsmitteln behandelt. Enteiweißung führt zwangsläufig zur Verdünnung der Proben, außerdem erhält man mit den gebräuchlichen Mitteln wie Trichlor-essigsäure, Perchlorsäure, Natriumwolframat- H_2SO_4 , Metaphosphorsäure oder Gerbsäure Filtrate mit stark saurer Reaktion, die für den enzymatischen Test nicht geeignet sind. Immerhin war es möglich durch Enteiweißung mit Perchlorsäure und anschließender Ausfällung durch K_3PO_4 oder durch Anwendung von 1,6 %iger Uranylacetatlösung annähernd neutrale Filtrate zu gewinnen. In den enteiweißten Seren konnte jedoch ebensowenig UDPGA nachgewiesen werden wie in den unbehandelten Serumproben. Daß der Proteingehalt des Serums keinen störenden Einfluß auf die UDPGA-Bestimmung ausübt, konnte auch durch Wiederfindungsversuche nachgewiesen werden. Von den dem Serum zugesetzten bekannten UDPGA-Mengen konnten im Mittel 96 % wiedergefunden werden.

Letztlich wurden auch Versuche mit gekochtem Serum und Vollblut angestellt, wobei in ähnlicher Weise wie bei der Aufbereitung der Gewebsextrakte verfahren wurde. Dann gelangten noch mit Alkohol behandelte Seren und Serum-Chloroformextrakte zur Untersuchung. In keinem Fall war ein sicherer Nachweis von UDPGA in den Überständen möglich.

Selbst in den Seren, bei denen sich eine geringe Differenz zwischen der Fluoreszenz der Analysenprobe und der Blindprobe ergab, was auf einen wenn auch sehr kleinen UDPGA-Gehalt der Probe (um $0,8 \mu\text{Mol/ml}$) hindeutete, war doch die Spezifität der UDPGA-Bestimmung sehr in Frage gestellt. Dieses ergab sich aus Vorversuchen mit unbehandelten Seren, die beim UDPGA-Test die gleichen Werte zeigten, unabhängig davon, ob den Ansätzen Mikrosomensuspension, also das Meßenzym, zugesetzt worden war oder nicht. Die Vermutung lag nahe, daß das verwendete Substrat MUBF durch eine im Serum vorhandene Glucuronyltransferase konjugiert worden war. Aktivitätsbestimmungen mit MUBF und UDPGA-Überschuß erbrachten jedoch nicht den Nachweis einer Glucuronyltransferaseaktivität im Serum. Vielmehr ist anzunehmen, daß sich bei der Inkubation von unbehandelten Seren auch andere MUBF-Konjugate möglicherweise auch auf nicht enzymatischem Wege bilden, was diese Befunde erklären könnte.

Bei der Untersuchung von Urinproben stellte sich heraus, daß die Verwendung von Urin ohne weitere Vorbehandlung zur UDPGA-Bestimmung mit einer so empfindlichen Methode, wie sie hier ausgearbeitet wurde, nicht möglich war. Durch andere im Urin enthaltene fluoreszierende Verbindungen traten sehr starke Fluoreszenzintensitäten auf, wodurch die Emission des eigentlichen Substrats völlig überlagert wurde und nicht mehr isoliert meßbar war. Urin kann durch Entionisieren und Entfärben im Ionenaustauscher zum Teil von diesen störenden Substanzen befreit werden, dabei würde aber die wenn überhaupt vorhandene sehr geringe UDPGA-Menge durch das Nachwaschen der Säulen so stark verdünnt, daß die Nachweisgrenze für UDPGA nicht erreicht würde.

14. Untersuchung tierischer Gewebe:

Zur Untersuchung gelangten Organe von 10 männlichen Meerschweinchen und von 10 weiblichen Ratten. Die unbehandelten Tiere wurden mit Nackenschlag jeweils zwischen 8 und 9 Uhr morgens getötet und entblutet. Den Meerschweinchen wurden Leber, Nieren und Gehirn entnommen und den Ratten Leber und Nieren herauspräpariert. Die Organe wurden sofort in eiskalter 0,15 M.KCl-Lösung auf 0 - 2°C abgekühlt und unter ständiger Eiskühlung weiterbehandelt. Nach dem Wiegen wurden die kleingeschnittenen Gewebsstücke im Glas-homogenisator nach POTTER mit Teflonstempel maschinell bei 600 Upm nicht länger als 20 sec homogenisiert. Dabei wurde den Geweben soviel eiskalte KCl-Lösung (0,15 M) zugesetzt, das 1 ml Homogenat 0,5 g Gewebe entsprach. Dieses 50 %ige Homogenat war das Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen, von dem Proben entnommen und je nach Bedarf weiter verdünnt werden konnten. Im einzelnen wurden folgende in vitro-Tests durchgeführt:

a) UDPGA-Bestimmung:

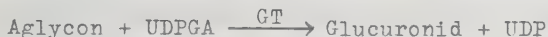
Das Homogenat wird zu Kochsaft aufbereitet, wie unter Punkt 11.b "Organkochsaft" beschrieben. Von dem gekochten Gewebsextrakt gelangen in der Regel 0,2 ml als Probe in den Ansatz, außer bei Geweben mit hohem UDPGA-Gehalt wie z.B. bei Meerschweinchenleber, wo man besser nur 0,1 ml Probe inkubiert, da sonst der Meßbereich überschritten wird. Weiter verfährt man wie unter Punkt 10. "UDPGA-Bestimmung" beschrieben.

Für die Bestimmung werden Doppelwerte angesetzt, außerdem wird ein Leerwert mitgeführt. Bei diesem pipettiert man die Probe erst nach der ersten Inkubation hinzu und schüttelt sofort mit Chloroform aus. Weiter wird der Leerwert genauso wie die anderen Ansätze behandelt.

Die Berechnung erfolgt wie angegeben (s.S. 44) für Probekolumina von 0,2 ml; bei Inkubation von 0,1 ml muß noch mit Faktor 2 multipliziert werden.

b) Bestimmung der Glucuronyltransferase-Aktivität
mit β -Methylumbelliferon (2, 19, 52):

Prinzip:



Das Gleichgewicht der Reaktion liegt bei pH 7,5 praktisch auf der rechten Seite. β -MUBF (als Aglycon) ist im alkalischen Bereich stark fluoreszierend, während das entsprechende Glucuronid unter denselben Bedingungen keine Fluoreszenz aufweist. So wird nach der Inkubation das Verschwinden der Fluoreszenz von β -MUBF in alkalischer Lösung gemessen.

Die hier angestellten GT-Aktivitätsbestimmungen wurden nach der von PERONA u. Mitarb. (52) angegebenen Methode durchgeführt:

<u>Ansatz:</u>	0,10 ml	Homogenat (5 %ig) in KCl, 0,154 M
	0,20 ml	UDPGA, di-Na-Salz, 8 mM (5,1 mg/ml)
	0,36 ml	β -Methylumbelliferon, 1 mM
	0,20 ml	Tris-Puffer, 0,15 M, pH 7,5
	0,04 ml	MgCl ₂ -Lösung, 0,3 M
	0,10 ml	KCl-Lösung, 0,154 M
	1,00 ml	Gesamtvolumen

Der Ansatz wird bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Kontrolle der Kinetik werden mehrere Inkubationszeiten vorgesehen. Nach 0, 15, 30 und wenn nötig 45 und 60 min werden dem Ansatz 0,1 ml entnommen und sofort mit Enteiweißungsgemisch (0,2 ml 0,66 n H₂SO₄, 0,2 ml 10 %ige Natriumwolframat-Lösung und 1,5 ml Aqua bidest.) versetzt. Für die Zeit Null wird zuerst das Enteiweißungsgemisch und dann die Probe (Homogenat) pipettiert. Nach dem Zentrifugieren werden 0,5 ml des Überstandes ad 5 ml mit 0,5 M Glycinpuffer, pH 10,3 aufgefüllt und die Fluoreszenz bei einer Primärstrahlung von 365 nm und einer Sekundärstrahlung von 440 nm gemessen. Als Standard dient der Zeitnullwert (F₀), mit dem 100 % Transmission eingestellt werden. Die Fluoreszenz des Glycinpuffers ergibt den Leerwert. Die Differenz zwischen der

Fluoreszenz des Standards (F_o) und der Fluoreszenz der nach der Zeit (t) entnommenen Probe (F_t) gibt direkt die Menge an glucuronidiertem β -MUBF in Prozent an. Da die Ansätze 360 μ Mol β -MUBF enthalten, läßt sich die Menge an Glucuronid wie folgt berechnen:

$$(F_o - F_t) \cdot \frac{360}{100} = \mu\text{Mol } \beta\text{-MUBF-Glucuronid}/t$$

Setzt man diesen Wert in Relation zu den mg Protein des Ansatzes, so erhält man μ Mol Substratumsatz / mg Protein / t als Maß für die Aktivität der Glucuronyltransferase.

c) Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode (58):

Der Eiweißgehalt des Untersuchungsmaterials wurde nach den Angaben von RICHTERICH (58) bestimmt, die sich an die Weichselbaum'sche Modifikation der Biuret-Methode anlehnen. Als Biuret-Reagenz wurde das Weichselbaum-Reagenz der Fa. E. MERCK, Darmstadt, verwendet. Bei den Bestimmungen wurde als Standard eine Lösung von kristallisiertem Rinderserumalbumin mitgeführt.

Bei der Bestimmung des Proteingehalts von Organextrakten wie Homogenaten oder Mikrosomensuspensionen führen manchmal schlecht lösliche Eiweiße oder Zelltrümmer zu Trübungen in den Analyseproben, die bei der Extinktionsmessung stören. Da die Farbintensität des Kupfer-Eiweiß-Komplexes nicht völlig stabil ist, sondern auch nach 30 min noch ein geringer Extinktionsanstieg auftritt, kann man diese Eigenschaft der Biuret-Reaktion ausnutzen, um auch schwer lösliche Proteine zu bestimmen. Das Analysenmaterial wird dann mit Biuret-Reagenz zerrieben und die Lösung bei Zimmertemperatur etwa 24 Std. stehen gelassen. Enthalten die Ansätze dann noch ungelöste Partikel, so werden diese abzentrifugiert.

d) Bestimmung der Desoxyribonucleinsäure (DNA) (38):

Bei der Untersuchung von zellulärem Material ist die Wahl der Bezugseinheit für Enzymaktivitäten oder Coenzymgehalte entscheidend für die Vergleichbarkeit der Werte von verschiedenen Organen oder Spezies. Die beste Bezugsgröße ist die, welche der aktiven Zellmasse möglichst nahe kommt. Günstiger als das Feuchtgewicht oder der Gewebestickstoff als Bezugsgröße ist der DNA-Gehalt der Gewebe, der ein Zelläquivalent darstellt, welches sich chemisch bestimmen läßt. Das DNA-Zelläquivalent wird deshalb immer häufiger als Bezugseinheit bei Organanalysen verwendet (26, 27, 54). Die DNA wurde hier fluorometrisch in einem Mikroverfahren nach KISSANE (38) bestimmt.

Prinzip: Nach Entfernung aller niedermolekularer, Desoxyribose enthaltenden Substanzen wird die DNA hydrolysiert; die freigesetzte Desoxyribose bildet mit Diaminobenzoesäure (DABA) eine fluoreszierende Verbindung, die sich fluorometrisch bestimmen läßt.

DABA-Reagenz: 1,5g 3,5-Diaminobenzoesäure werden in 7,5ml 4 n HCl gelöst und dazu 0,2 g Norit-A Tierkohle suspendiert. Nach 30 min wird zentrifugiert und der Überstand noch ein bis drei mal mit Norit-A Kohle in gleicher Weise extrahiert, bis das wasserklare Reagenz gerade eben noch gelblich tingiert ist. Bis zum Gebrauch wird das Reagenz möglichst kalt, am besten bei -20°C in der Kühltruhe aufbewahrt. DABA-Reagenz muß täglich frisch angesetzt werden.

DNA-Standardlösung: Eine Vorratslösung von 0,5 - 1 mg DNA pro ml 1 n NH_4OH wird angesetzt und bei 4°C gelagert. Hiervon werden jeweils Verdünnungen, im allgemeinen 1:100 in 1 n NH_4OH , hergestellt. Als Standard-DNA wurde hier eine Herings-DNA benutzt mit einem Phosphorgehalt von 9,3 %. Theoretischer Phosphorgehalt: 9,35 %.

DNA-Bestimmung: Dem Ansatz werden 50 oder 100 μ l Homogenat, je nach Konzentration, und das gleiche Volumen an 0,6 M Trichloressigsäure zugesetzt und zentrifugiert. Ansatz und Zentrifugation erfolgen unter ständiger Kühlung bei etwa 4°C, die weiteren Reaktionsschritte werden bei Raumtemperatur vorgenommen. Etwa 4/5 des Überstandes werden verworfen, der Rückstand wird mit 1,2 ml äthanolischer KaliumazetatLösung aufgefüllt. Nach 10 min Stehen wird zentrifugiert, 1 ml vom Überstand verworfen und zum Rückstand 1 ml Äthanol gegeben. Der Ansatz wird dann 15 min bei 60°C inkubiert, abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes wieder mit 1 ml Äthanol aufgefüllt. Nach einer letzten Zentrifugation wird vom Überstand 1 ml verworfen und der Rückstand im Exsikkator getrocknet. In gleicher Weise wird ein DNA-Standard und ein Standard-Leerwert getrocknet, der anstelle der DNA-Lösung das gleiche Volumen 1 n NH_4OH enthält.

In die vollständig getrockneten Proben werden 150 μ l DABA-Reagenz gegeben und 30 min bei 60°C gehalten. Dann wird 1 ml 0,6 n Perchlorsäure zugegeben und die Fluoreszenz in 4 mm Halbmikro-Küvetten bei einer Primärstrahlung von 405 nm und einer Sekundärstrahlung von 520 nm gegen einen Chininstandard (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 0,1 n H_2SO_4) gemessen.

DNA-Berechnung:

$$\frac{F_P - F_{LW}}{F_{St} - F_{StLW}} \cdot C_{St} = \text{mg DNA} / \begin{matrix} \text{Homogenatvolumen} \\ \text{im Ansatz} \end{matrix}$$

F_P	=	Fluoreszenz	der Probe
F_{LW}	=	"	des Probenleerwerts
F_{St}	=	"	des DNA-Standards
F_{StLW}	=	"	des Standard-Leerwerts
C_{St}	=	Konzentration	der DNA-Standardlösung

15. Statistische Auswertung der Versuche:

Die untersuchten Tiere sind nach genetischer Beschaffenheit, Geschlecht, Alter und Körpergewicht vergleichbar. Die einzelnen Werte sind an verschiedenen Individuen gemessen, d.h. sie sind nicht verbunden.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ($\bar{x}$), die Streuungen als Standardabweichungen (s_x) angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit der Streuungen sind die Standardabweichungen außerdem in Prozent des Mittelwertes angegeben (sog. Variationskoeffizient V.K.%).

Die Signifikanz von Mittelwertsdifferenzen wurde mit dem t-Test nach STUDENT geprüft. Ebenso wurde der t-Test zur Überprüfung der Gesetzmäßigkeit von beobachteten Korrelationen angewendet.

Ergebnisse

1. Charakterisierung der Methode:

Ziel der Experimente war, eine enzymatische Methode zur quantitativen Bestimmung der Uridindiphosphatglucuronsäure (UDPGA) auszuarbeiten. Die Ergebnisse der Versuche, die zu einer weitgehenden Optimierung der einzelnen Reaktionsschritte der Methode führten, sind im einzelnen im experimentellen Teil, Punkt 1. bis 11., enthalten. Als Endergebnis kann die zusammenfassende Arbeitsvorschrift für die UDPGA-Bestimmung angesehen werden, die unter Punkt 10. wiedergegeben ist.

Die Brauchbarkeit der so definierten Methode in bezug auf Richtigkeit, Präzision und Empfindlichkeit des Verfahrens geht aus den Wiederfindungsversuchen (Punkt 12.) hervor. Dazu wurden biologischem Material bekannte Mengen UDPGA zugesetzt. Die Aufbereitung erfolgte wie unter Punkt 11.b beschrieben. Ergebnisse mit Standardabweichungen zeigen die Tabellen 4 und 5. Aus Organkochsaft von Lebergewebe konnten im Mittel 96 - 98 % der zugesetzten UDPGA wiedergefunden werden bei einer Standardabweichung von 3 - 5 %. Versuche mit Nierenhomogenat erbrachten Werte der gleichen Größenordnung.

Mit dem hier definierten Bestimmungsverfahren können 0,5 - 20 μg UDPGA/ml Ansatz gemessen werden. Die Empfindlichkeit der Methode, für praktische Zwecke ist sie gleich dem Zweifachen der mittleren Standardabweichung, beträgt dabei 0,83 μg UDPGA/ml Ansatz.

Die Spezifität der UDPGA-Bestimmung kann als absolut bezeichnet werden, da das Verfahren aus zwei hintereinandergeschalteten, spezifischen Enzymreaktionen besteht (UDPGA-Umsetzung durch Glucuronyltransferase und Glucuronidspaltung durch β -Glucuronidase).

2. Untersuchung menschlicher Proben:

Wie schon im experimentellen Teil unter Punkt 13. beschrieben wurde, konnte in menschlichen Proben wie Blut, Serum und Urin kein UDPGA-Gehalt mit Sicherheit nachgewiesen werden.

3. Untersuchung tierischer Gewebe:

Mit der oben charakterisierten Methode wurde die Uridindiphosphatglucuronsäure (UDPGA) in Organen von Meerschweinchen und Ratten bestimmt. Außerdem wurde die Glucuronyltransferase (GT) der betreffenden Gewebe untersucht.

Die UDPGA-Werte wurden bezogen auf 100 g Organfeuchtgewicht (FG) und auf mg Desoxyribonucleinsäure (DNA). Für die Enzymaktivitäten wurden Homogenatvolumen (ml Homogenat, 5%ig g/v), mg Protein und mg DNA als Bezugseinheit gewählt. Es ergaben sich folgende Mittelwerte mit Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$):

Meerschweinchen (Tab. 6 - 11)

a) Leber:

UDPGA-Gehalt	63,5 $\pm$ 15,1	μ Mol/100g FG
	112,2 $\pm$ 25,0	m μ Mol/mg DNA
GT-Aktivität	63,4 $\pm$ 9,9	m μ Mol/ml Homog./min
	228,6 $\pm$ 49,0	m μ Mol/mg DNA/min
	7,5 $\pm$ 1,7	m μ Mol/mg Prot./min

b) Nieren:

UDPGA-Gehalt	7,3 $\pm$ 1,1	μ Mol/100g FG
	16,5 $\pm$ 3,9	m μ Mol/mg DNA
GT-Aktivität	11,2 $\pm$ 3,3	m μ Mol/ml Homog./min
	49,0 $\pm$ 10,8	m μ Mol/mg DNA/min
	2,6 $\pm$ 0,5	m μ Mol/mg Prot./min

c) Gehirn:

UDPGA-Gehalt	1,3 $\pm$ 0,009	μ Mol/100g FG
	3,3 $\pm$ 0,3	m μ Mol/mg DNA
GT-Aktivität	1,5 $\pm$ 0,6	m μ Mol/ml Homog./min
	7,4 $\pm$ 3,5	m μ Mol/mg DNA/min
	0,42 $\pm$ 0,44	m μ Mol/mg Prot./min

Ratten (Tab. 12 - 14)

a) Leber:

UDPGA-Gehalt	$11,4 \pm 1,6$ $\mu\text{Mol}/100\text{g FG}$
	$19,8 \pm 3,8$ $\mu\text{Mol}/\text{mg DNA}$
GT-Aktivität	$37,3 \pm 15,6$ $\mu\text{Mol}/\text{ml Homog.}/\text{min}$
	$128,0 \pm 48,4$ $\mu\text{Mol}/\text{mg DNA}/\text{min}$
	$3,1 \pm 1,0$ $\mu\text{Mol}/\text{mg Prot.}/\text{min}$

b) Nieren:

UDPGA-Gehalt	$2,7 \pm 0,4$ $\mu\text{Mol}/100\text{g FG}$
--------------	--

GT-Aktivität: Da bei Rattennieren nur wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand, und es vor allem auf den UDPGA-Wert ankam, konnte die GT-Aktivität dieser Gewebe nicht bestimmt werden.

4. Korrelationen:

Weiterhin wurden sämtliche von den Meerschweinchen gewonnenen Daten zu Korrelationsberechnungen herangezogen. Es sollte überprüft werden, ob Gesetzmäßigkeiten im Sinne von einfach linearen Regressionen vorliegen.

Aus den 23 miteinander korrelierten Variablen (Tab. 6-11) ergeben sich 253 Korrelationsmöglichkeiten, die jeweils durch einen Korrelationskoeffizienten (r) charakterisiert sind. Statistisch lassen sich dabei 5 lineare Regressionen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$, 16 lineare Beziehungen mit $p < 0,05$ und 6 statistisch nicht gesicherte jedoch auffällige Korrelationen nachweisen.

Im einzelnen gehen die Beziehungen zwischen den Variablen aus der Korrelationsmatrix (Abb. 22) hervor. Durch einen positiven oder negativen Korrelationskoeffizienten gekennzeichnet sind hier nur die signifikanten und die zumindest auffälligen Korrelationen. Die Variablen sind im

Abb. 22: Korrelationskoeff. - Matrix

Meerschweinchen, $\sigma^2(N=10)$

r mit xx $p < 0.01$

r mit $x \quad p < 0,05$

ohne $\times$ n.s., stat. auffällig

[illegible]

Diagramm der Abbildung 22 so eingeteilt, daß im mittleren rechteckigen Feld der Übersicht die Beziehungen zwischen den Werten der Leber und der Nieren erscheinen, aus den beiden dreieckigen Feldern gehen die Abhängigkeiten der Nierenwerte und der Leberwerte untereinander hervor.

Die Gehirnwerte der Meerschweinchen wurden nicht mit aufgeführt, da ihre Auswertung keine in diesem Zusammenhang relevanten Resultate erbrachte.

Tab. 6: Meerschweinchen - Lebendgewichte und Organfeuchtgewichte.

MS-Nr.	Lebendgew. (g)	Leber (g)	Niere (g)	Gehirn (g)
1	475	16,84	3,71	2,62
2	400	18,80	4,20	3,75
3	440	14,15	3,80	3,30
4	460	16,07	3,61	3,27
5	450	17,45	3,25	3,62
6	340	12,41	3,00	3,50
7	400	14,72	3,20	3,24
8	420	17,60	3,32	3,40
9	350	12,31	3,21	3,66
10	400	13,88	3,29	3,65
Mittelwert ($\bar{x}$)	413,5	15,48	3,45	3,40
Stand.-Abw. (s_x)	44,72	2,22	0,36	0,32
V.K. %	10,8 %	14,4 %	10,5 %	9,7 %

Tab. 7: Meerschweinchen - DNA- und Proteingehalt der Organhomogenate (5 %ig g/v) angegeben in mg DNA bzw. Protein/ml Homogenat.

MS-Nr.	Leber		Niere		Gehirn	
	DNA	Protein	DNA	Protein	DNA	Protein
1	0,250	10,0	0,200	4,4	0,215	5,3
2	0,238	9,8	0,238	5,2	0,200	4,0
3	0,319	9,0	0,200	4,4	0,182	7,1
4	0,256	9,2	0,231	4,0	0,230	4,8
5	0,275	8,3	0,266	4,0	0,215	1,1
6	0,313	7,1	0,206	4,2	0,195	5,8
7	0,266	9,2	0,191	2,7	0,240	6,5
8	0,344	6,9	0,184	2,7	0,188	4,1
9	0,344	9,4	0,225	4,8	0,235	7,3
10	0,232	7,5	0,363	5,6	0,225	7,1
Mittel ($\bar{x}$)	0,283	8,64	0,230	4,20	0,212	5,31
St.-Abw. (s_x)	0,042	1,22	0,052	0,94	0,020	1,92
V.K. %	14,8 %	14,1 %	22,6 %	22,4 %	9,4 %	36,1 %

Tab. 8: Meerschweinchen - UDPGA-Gehalt von Leber,
Niere und Hirn bezogen auf 100g Feuchtgewicht
(FG) und mg DNA.

MS-Nr.	UDPGA-Leber		UDPGA-Niere		UDPGA-Gehirn	
	μMol	$\text{m}\mu\text{Mol}$	μMol	$\text{m}\mu\text{Mol}$	μMol	$\text{m}\mu\text{Mol}$
	100g FG	mg DNA	100g FG	mg DNA	100g FG	mg DNA
1	62,0	124	8,02	20,0	1,39	3,25
2	31,5	67	8,20	17,3	1,39	3,49
3	64,2	101	7,45	18,6	1,39	3,84
4	78,4	153	8,95	19,4	1,39	3,04
5	65,6	119	6,94	13,0	1,39	3,25
6	83,8	134	5,38	13,0	1,39	3,68
7	70,0	131	6,46	16,9	1,40	2,92
8	72,7	105	8,56	23,2	1,41	3,75
9	60,7	88	6,18	13,7	1,41	3,01
10	46,8	100	7,70	10,6	1,41	3,15
Mittel ($\bar{x}$)	63,57	112,20	7,38	16,57	1,39	3,33
St.Abw. (s_x)	15,19	25,01	1,13	3,91	0,009	0,330
V.K. %	23,8 %	22,3 %	15,3 %	23,6 %	0,6 %	10,0 %

Tab. 9 : Meerschweinchen - Glucuronyltransferase-Aktivität (GT-Akt.) der Leber als Volumenaktivität und bezogen auf DNA und Protein.

MS-Nr.	GT-Akt. $\mu\text{Mol/ml H/min}$	GT-Akt. $\mu\text{Mol/mgDNA/min}$	GT-Akt. $\mu\text{Mol/mgProt./min}$
1	49,8	200	4,98
2	55,2	232	5,58
3	72,0	226	8,00
4	68,5	268	7,45
5	76,2	278	9,20
6	70,2	225	9,90
7	53,4	201	5,80
8	53,4	155	7,75
9	61,2	181	6,52
10	74,4	320	9,91
Mittelwert ($\bar{x}$)	63,43	228,60	7,50
St.-Abw. (s_x)	9,93	49,03	1,78
V.K. %	15,4 %	21,6 %	23,8 %

Tab. 10: Meerschweinchen - Glucuronyltransferase-
Aktivität der Niere als Volumenaktivität
und bezogen auf DNA und Protein.

MS-Nr.	GT-Akt. μMol/mlHo/min	GT-Akt. μMol/mgDNA/min	GT-Akt. μMol/mgProt./min
1	9,30	46,5	2,11
2	16,00	67,3	3,08
3	7,8	39,0	1,77
4	9,6	41,5	2,18
5	10,8	40,6	2,70
6	11,0	53,2	2,62
7	8,4	44,0	3,11
8	8,4	45,6	3,11
9	15,6	69,4	3,25
10	15,9	43,8	2,84
Mittelwert ($\bar{x}$)	11,28	49,09	2,67
St.-Abw. (s_x)	3,30	10,87	0,50
V.K. %	29,3 %	22,1 %	18,7 %

Tab. 11: Meerschweinchen - Glucuronyltransferase-Aktivität des Gehirns als Volumenaktivität und bezogen auf DNA und Protein.

MS-Nr.	GT-Akt. mμMol/mlHo/min	GT-Akt. mμMol/mgDNA/min	GT-Akt. mμMol/mgProt./min
1	2,10	9,77	0,396
2	1,20	6,00	0,300
3	1,20	6,60	0,169
4	1,20	5,22	0,250
5	1,80	8,38	1,600
6	1,20	6,15	0,207
7	1,56	6,50	0,240
8	3,00	15,95	0,732
9	1,80	7,66	0,247
10	0,60	2,66	0,085
Mittelw.	1,56	7,48	0,422
St.-Äbw.	0,66	3,52	0,449
V.K. %	42,3 %	47,1 %	106,7 %

Tab. 12: Ratten - Lebendgewichte, Organfeuchtgewichte und DNA- sowie Proteingehalt der 5 %igen (g/v) Leberhomogenate.

R-Nr.	Lebend- gew. (g)	L e b e r			Niere
		Feucht- gew. (g)	DNA mg/ml	Protein mg/ml	Feucht- gew. (g)
1	200	5,6	0,306	11,3	1,64
2	195	5,2	0,241	11,5	1,80
3	200	6,1	0,303	11,3	1,26
4	250	8,6	0,306	13,4	1,75
5	230	7,1	0,254	14,9	1,40
6	180	6,1	0,325	10,9	1,33
7	240	9,6	0,234	11,1	1,62
8	190	7,7	0,237	9,2	1,54
9	220	7,0	0,350	13,4	1,50
10	235	7,5	0,375	10,0	1,60
Mittel ($\bar{x}$)	214,0	7,05	0,293	11,70	1,544
St.-Abw. (s_x)	24,01	1,36	0,049	1,716	0,174
V.K. %	11,2 %	19,3 %	16,7 %	14,6 %	11,3 %

Tab. 13: Ratten - UDPGA-Gehalt von Leber und Niere bezogen auf 100g Frischgewicht(FG) und mg DNA.

R-Nr.	L e b e r		Niere
	UDPGA $\mu\text{Mol}/100\text{g FG}$	UDPGA $\text{m}\mu\text{Mol}/\text{mg DNA}$	UDPGA $\mu\text{Mol}/100\text{g FG}$
1	10,8	17,6	3,68
2	9,8	20,3	2,45
3	9,8	16,2	2,35
4	12,3	20,1	3,25
5	11,9	23,4	2,73
6	14,4	22,1	2,55
7	11,0	23,5	2,23
8	11,6	24,5	2,62
9	13,3	19,0	2,45
10	9,1	12,1	2,70
Mittelwert ($\bar{x}$)	11,40	19,88	2,701
St.-Abw. (s_x)	1,654	3,830	0,442
V.K. %	14,5 %	19,3 %	16,3 %

Tab. 14: Ratten - Glucuronyltransferase-Aktivität
(GT-Akt.) der Leber als Volumenaktivität
und bezogen auf DNA und Protein.

R-Nr.	GT-Akt. $\mu\text{Mol/mlHo/min}$	GT-Akt. $\mu\text{Mol/mgDNA/min}$	GT-Akt. $\mu\text{Mol/mgProt./min}$
1	39,7	130	3,51
2	40,7	169	3,54
3	37,4	123	3,30
4	72,0	235	5,37
5	32,4	128	2,17
6	24,0	74	2,20
7	21,6	93	1,95
8	21,6	92	2,34
9	53,0	152	3,95
10	31,4	84	3,14
Mittelwert ($\bar{x}$)	37,38	128,0	3,147
St.-Abw. (s_x)	15,62	48,42	1,045
V.K. %	41,8 %	37,8 %	33,3 %

Diskussion

1. Zur Methodik der UDPGA-Bestimmung:

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, brachten alle bisherigen Versuche, UDPGA enzymatisch zu bestimmen, keine befriedigenden Resultate. Bei der von MILLS und SMITH (47) und von DUTTON (13) angewendeten o-Aminophenolmethode führen Substanzen wie p-Aminobenzoesäure und Glycogen zur Störung bzw. Überlagerung der Farbreaktion. Diese Unsicherheiten konnte KAWADA (37) durch die Verwendung von Phenolphthalein als Aglycon, welches vor ihm schon ISSELBACHER (34) und STROMINGER (63) zur Untersuchung der Glucuronidsynthese einsetzten, ausschalten. Wenn auch die von KAWADA mitgeteilten Ergebnisse der Wiederfindungsversuche mit seiner verbesserten Methode recht überzeugend ausfallen, so entzieht sich doch die Brauchbarkeit der Methode hier der Diskussion, da Angaben über die Art des Untersuchungsmaterials und Ergebnisse von Organanalysen fehlen.

Mit β -Methylumbelliferon (MUBF) als Substrat, wie es von TAKETA (65) und auch hier verwendet wurde, läßt sich durch die fluorometrische Messung UDPGA viel empfindlicher bestimmen und weitgehend frei von störenden Nebenreaktionen, wie eigene Versuche gezeigt haben. Unvorhersehbare Löscheffekte durch Protein oder andere Reagenzien, auf die DUTTON (13) hinwies, konnten nicht beobachtet werden. Lediglich ein zu hoher Proteingehalt der Ansätze kann zu einer Fluoreszenzminderung führen; dabei handelt es sich jedoch weniger um einen Löscheffekt als vielmehr um einen Substratverlust, einhergehend mit der Proteinpräzipitation durch das Ausschütteln mit Chloroform. Wird eine bestimmte Proteinkonzentration nicht überschritten, so bleibt die Enteiweißung ohne Einfluß auf die Wiederfindung von MUBF-Glucuronid als freies MUBF, was hier (Tab. 2) und vorher schon von TAKETA (65) nachgewiesen werden konnte.

Bei DUTTON (13) wie auch bei TAKETA (65) bestanden weitere Unsicherheitsfaktoren für die UDPGA-Bestimmung darin, daß

Leberhomogenat als Enzymquelle für die Glucuronyltransferase-Reaktion verwendet wurde; je nach dem Gehalt des Homogenats an GT-Aktivatoren wie z.B. ATP oder UDP-N-acetylglucosamin, wurden höhere oder niedrigere UDPGA-Konzentrationen vorgetauscht, hinzu kommt die schon in der Einleitung beschriebene Bildung von "endogenem Glucuronid". Diese Fehler lassen sich bei der hier ausgearbeiteten Methode dadurch vermeiden, daß man gewaschene Mikrosomen von Meerschweinchenleber als Meßenzym verwendet und die GT außerdem durch Zusatz von Triton X-100 optimal aktiviert. Dadurch wird ein vollständiger UDPGA-Umsatz erzielt, und zusätzlich kann die Mikrosomenkonzentration der Ansätze gesenkt werden. So wird einmal eine zu hohe Proteinkonzentration im Test vermieden, zum andern kann die von verschiedenen Autoren (13, 19, 52, 65) beschriebene antagonistische Wirkung lysosomaler β -Glucuronidase weitgehend vernachlässigt werden.

Optimale Bedingungen für die GT-Reaktion sowie für die darauffolgende Hydrolyse durch bakterielle β -Glucuronidase wurden im einzelnen experimentell ermittelt. Die Glucuronidspaltung im 2. Reaktionsschritt erfolgte unter den dafür gewählten Bedingungen vollständig, wie dieses auch von TAKETA (65) angegeben wurde, im Gegensatz zu ARIAS (Lit. bei 65), der mitgeteilt hatte, daß eine Fluoreszenzwiederherstellung von mehr als 80 % nach Hydrolyse von MUBF-Glucuronid mit β -Glucuronidase nicht möglich gewesen war.

Ein mehr technisches Problem stellte die Enteiweißung der Ansätze mit gleichzeitiger Extraktion des überschüssigen MUBF mit Chloroform dar. Laborübliche Schüttelgeräte brachten nur unbefriedigende Ergebnisse, sodaß ein spezielles Ausschüttelsystem entwickelt werden mußte. Erst dadurch war es möglich, mehrere Versuchsansätze gleichzeitig und gleichartig zu behandeln, was für die Vergleichbarkeit der Resultate notwendig ist. Dieses führte auch zu einer größeren Rationalisierung des Versuchsablaufs, sodaß auch Reihenuntersuchungen größerer Art mit dem Bestimmungsverfahren möglich werden. Aus den Versuchen mit dem Schüttelsystem ging auch hervor, daß die Präzision der UDPGA-Bestimmung durch das Ausschütteln gesteigert wird, was an den geringeren Standardabweichungen der ausgeschüttelten Testreihen zu erkennen ist (Tab. 2).

Brauchbarkeit sowie Grenzen der Methode wurden durch Wiederfindungsversuche demonstriert (Tab. 4 u. 5). Es können 0,5 - 20 μ g UDPGA bestimmt werden mit einer Standardabweichung von 3 - 5 %. Die Größe der Standardabweichung wird nicht durch die Aufbereitung bedingt, sondern durch den enzymatischen Test und die fluorometrische Messung; Testserien mit wäßrigen UDPGA-Lösungen zeigen nämlich Standardabweichungen in der gleichen Größe wie bei den Wiederfindungsversuchen aus biologischem Material. Die Ergebnisse der Wiederfindung aus hitzebehandeltem Nierenhomogenat unterscheiden sich größenordnungsmäßig nicht von den Resultaten der Versuche mit ebenso behandeltem Leberhomogenat, obwohl im Nierengewebe mit einem stärkeren UDPGA-Zerfall zu rechnen ist, bedingt durch die Aktivität der Nieren-Pyrophosphatase (53, 62). Dieser Metabolismus kommt unter den Bedingungen der hier angewendeten Aufbereitungsmethode anscheinend nicht zur Auswirkung.

Im Gegensatz zu den bei DUTTON u. STOREY (14) als wolkige, grau-grüne Überstände beschriebenen Gewebsextrakten, waren die nach eigenem Verfahren hergestellten Organkochsäfte stets klar und serumfarben und konnten ohne zusätzliche Behandlung mit Säuren o.ä. zur UDPGA-Bestimmung verwendet werden. Außerdem ließen sich die Extrakte bei -23°C wochenlang lagern, ohne daß ein wesentlicher Nucleotidverlust eintrat. Hitzedenaturierte Organextrakte, wie sie hier hergestellt wurden, haben sich gegenüber allen anderen Aufbereitungen für die enzymatische UDPGA-Bestimmung als am brauchbarsten erwiesen (Tab. 3). Wenn die Herstellung auch etwas zeitraubender ist, als z.B. die Verwendung von einfachen Homogenaten, wie TAKETA (65) sie zur direkten UDPGA-Bestimmung inkubiert hat, so sind die Ergebnisse doch wesentlich zuverlässiger, da bei Inkubation von Homogenat ein UDPGA-Zerfall einsetzt, der in Geschwindigkeit und Ausmaß im einzelnen nicht abzuschätzen ist. Dieses konnte auch in eigenen Versuchen nachgewiesen werden (Abb. 18).

Gekochte Gewebsextrakte sind auch deshalb für den UDPGA-Nachweis prädestiniert, weil es sich bei UDPGA um eine äußerst thermostabile Verbindung handelt. Außerdem kann das so behandelte biologische Material ohne eine weitere Fraktionierung der Nucleotide den Bestimmungsansätzen zugesetzt werden.

Wenn ZHIVKOV (73) 1970 schrieb, daß ein genauer Nachweis von UDPGA bislang nicht möglich war, weil es keine brauchbare Methode zur Isolation des Nucleotids gab, so hat er dieses wohl mehr auf chromatographische Verfahren bezogen und die Möglichkeiten der enzymatischen Analyse außer acht gelassen.

Problematischer wird die UDPGA-Bestimmung aus Organkochsaft, wenn Gewebeproben von weniger als 500 mg verfügbar sind. Für kleine Gewebeproben wurde deshalb eine Geräteanordnung verwendet, mit deren Hilfe sich auch noch ausreichende Kochsaftmengen aus 1 ml Homogenatvolumen gewinnen lassen. Das Bestimmungsverfahren ist insofern kompatibel, als man verschieden konzentrierte Homogenate aufbereiten oder verschiedene Probevolumina einsetzen kann. Von menschlicher Leber können durch Nadelbiopsie Proben von höchsten 40 - 60 mg Gewicht gewonnen werden. Würde man hier z.B. 5 %ige Homogenate aufbereiten, so müßte sich im gekochten Extrakt UDPGA noch gut bestimmen lassen, da nach den von TAKETA (65) ermittelten UDPGA-Werten für normale menschliche Leber mit etwa $3,89 \mu\text{Mol UDPGA}/10 \text{ mg Feuchtgewicht}$ zu rechnen ist. Wahrscheinlich liegen die Werte aber noch höher.

Durch die Verwendung von β -Methylumbelliferon als Substrat, welches fluorometrisch bestimmt werden kann, ist die hier ausgearbeitete Bestimmungsmethode in bezug auf die Empfindlichkeit allen anderen Verfahren, die z.B. auf Absorptionsmessungen beruhen, überlegen. Eine Empfindlichkeitssteigerung während der Fluoreszenzmessung kann zusätzlich erreicht werden, wenn man einen stärker verdünnten Chininstandard verwendet. Daraus resultiert ein steilerer Anstieg der Eichkurve, man erhält jedoch nur eine relativ größere Empfindlichkeit im Sinne einer Spreizung der Ableseskala.

Ein Nachteil des Verfahrens ist die Instabilität der Fluoreszenz von MUBF. Die Ansätze müssen vor längerer Lichteinwirkung geschützt werden, und bei der Messung müssen die Emissionswerte sofort am Photometer abgelesen werden, da die Fluoreszenzintensität während der Einwirkung der Primärstrahlung abfällt. Die Wiederholung einer Messung derselben Probe ist nicht möglich; ebenso kann man mit MUBF als Substrat keine kinetischen Bestimmungen ablaufen lassen.

2. Organanalysen:

Mit der hier ausgearbeiteten Methode wurde der UDPGA-Gehalt von Organen von Meerschweinchen und Ratten bestimmt, um die so erhaltenen Werte mit den in der Literatur bisher gemachten Angaben vergleichen zu können. Die UDPGA-Konzentrationen variieren von Gewebe zu Gewebe und sind in den Meerschweinchenorganen höher als in den vergleichbaren Organen der Ratten.

Tabelle 15 zeigt die eigenen Werte im Vergleich mit den Angaben anderer Autoren, die vorwiegend chromatographische Verfahren zur UDPGA-Bestimmung anwendeten. Um so erstaunlicher ist die gute Übereinstimmung mit den hier enzymatisch bestimmten UDPGA-Werten. Besonders die Angaben von ZHIVKOV (73) eignen sich gut zum Vergleich. ZHIVKOV teilte erstmals ein einfaches Verfahren zur Isolation von UDPGA durch eindimensionale Papierchromatographie mit. Die Trennung der Nucleotide erfolgte vorher nach dem quantitativen Verfahren von TSUBOI und PRICE (67) mit Norit-A. In Wiederfindungsversuchen mit seiner Methode konnte ZHIVKOV (73) 92 % der zugesetzten UDPGA-Menge bestimmen.

Die Angaben von HURLBERT u. POTTER (32) über den UDPGA-Gehalt der Rattenleber gehen aus einer Arbeit über den Stoffwechsel von Uridinnucleotiden hervor. Radioaktiv markierte UDPGA wurde hier aus säurelöslichen Fraktionen von Lebergewebe durch Anionenaustauscherchromatographie isoliert und anhand der spezifischen Aktivität des radioaktiven Uridinphosphats bestimmt.

In seiner Arbeit über phosphathaltige Metabolite säurelöslicher Rattenleberextrakte isolierte HELDT (28) UDPGA mittels Anionenaustauschchromatographie und Hochspannungselektrophorese. Die Berechnung des Nucleotidgehalts erfolgte aus den Werten der UV-Absorptionsmessung sowie der Phosphat-Bestimmung.

Auch die von HAMMAR (25) enzymatisch bestimmten und auf DNA bezogenen UDPGA-Konzentrationen der Leber unbehandelter Meerschweinchen stimmen mit den eigenen Werten größenordnungsmäßig überein, wobei die Streuungen stärker abweichen. Der UDPGA-Wert für Meerschweinchenieren ist bei HAMMAR (25) jedoch

Tab. 15: UDPGA-Konzentrationen in Leber und Nieren von Meerschweinchen und Ratten nach den Angaben verschiedener Autoren.

Organ	N	G	UDPGA-Gehalt		Test	Autor
			$\mu\text{Mol}/100\text{g FG}$	$\mu\text{Mol}/\text{mg DNA}$		
Meer- schw. Leber	12	♂	$41,3 \pm 10,4$	-	chr.	ZHIVKOV (73)
	10	♂	-	121 ± 16	enz.	HAMMAR (25)
	10	♂	$63,5 \pm 15,1$	112 ± 25	enz.	eigener Wert
Meer- schw. Niere	12	♂	$7,0 \pm 1,7$	-	chr.	ZHIVKOV (73)
	6	♂	-	$86,0 \pm 18,0$	enz.	HAMMAR (25)
	10	♂	$7,3 \pm 1,1$	$16,5 \pm 3,9$	enz.	eigener Wert
Ratten Leber	4	?	$10,0 \pm ?$	-	chr.	HURLBERT+P. (32)
	2	?	$11,3 \pm ?$	-	chr.	HELDT (28)
	10	♂	$12,1 \pm 1,6$	-	chr.	ZHIVKOV (73)
	10	♀	$11,4 \pm 1,6$	$19,8 \pm 3,8$	enz.	eigener Wert
Ratten Niere	10	♂	$3,7 \pm 1,2$	-	chr.	ZHIVKOV (73)
	10	♀	$2,7 \pm 0,4$	-	enz.	eigener Wert

Abkürzungen:

N = Anzahl der untersuchten Tiere

G = Geschlecht

FG = Organfeuchtgewicht

enz. = enzymatische UDPGA-Bestimmung

chr. = chromatographische UDPGA-Bestimmung

5 mal so groß wie der eigene Wert. Die Ursache dieser Abweichung konnte nicht geklärt werden, möglicherweise ist sie durch die Art der Aufbereitung des Gewebes bedingt.

Die auf DNA bezogenen Werte können mit den auf Feuchtgewicht bezogenen UDPGA-Konzentrationen verglichen werden, wenn der DNA-Gehalt der Organe bekannt ist. Diesbezügliche Angaben sind jedoch in der Literatur sehr abweichend (7, 9, 70). Auch die von HAMMAR (25) und in der eigenen Arbeit nach KISSANE (38) fluorometrisch bestimmten DNA-Gehalte der Gewebe sind unterschiedlich. Die Werte stimmen aber in der Relation mit den von LESLIE (40) mitgeteilten DNA-Werten überein (450 mg DNA/100 g Meerschweinchenleber und 385 mg DNA/100 g Meersch.-Nieren). Beim Vergleich der auf DNA bezogenen Enzymaktivitäten oder Nucleotidkonzentrationen mit gewichtsbezogenen Werten erfolgt die Umrechnung am besten einheitlich nach den von LESLIE (40) angegebenen DNA-Werten.

In den wenigen Arbeiten, in denen vergleichbare UDPGA-Konzentrationen von tierischen Geweben mitgeteilt werden, wird der Nucleotidgehalt vorwiegend auf das Frisch- oder Feuchtgewicht (FG) bezogen. Günstiger als die Bezugsgröße Feuchtgewicht, die von der Hydratation des Gewebes abhängt, oder der Gewebsstickstoff als Bezugseinheit, welche von metabolisch inertem Eiweiß beeinflusst wird, erscheint der DNA-Gehalt der Gewebe (54, 71), da dieser als Bezugseinheit bei der Analyse von zellulärem Material der aktiven Zellmasse sehr nahe kommt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Protein- und DNA-Gehalt bestimmt, sodaß sich die Möglichkeit ergibt, die auf verschiedene Größen bezogenen UDPGA-Gehalte und GT-Aktivitäten der Gewebe vergleichen zu können und anhand der unterschiedlichen Streuungen den Einfluß der einzelnen Bezugsgrößen auf die Resultate beurteilen zu können.

Bei der Betrachtung der in Prozent der Mittelwerte ausgedrückten Standardabweichungen ergeben sich recht unterschiedliche Aspekte (Tab. 16). Zunächst muß davon ausgegangen werden, daß die von verschiedenen Individuen gewonnenen Werte

mehr oder weniger großen Schwankungen unterworfen sind, die in den Bereich der biologischen Streuung fallen. Zusätzlich werden die Ergebnisse noch von der technischen Streuung der verschiedenen Untersuchungsmethoden beeinflusst. Wenn die Abweichung der Lebend- und der Organgewichte der Tiere die biologische Streuung in etwa wiedergibt, dann läge diese bei Meerschweinchen zwischen 10 und 14 % und bei Ratten zwischen 11 und 19 %. Die Protein- und DNA-Gehalte der Homogenate würden dann mit 14,1 und 14,8 % bei Meerschw.-Leber und mit 14,6 u. 16,4 % für Rattenleber auch noch in den Bereich der biologischen Streuung fallen. Bei Meerschw.-Nieren ist die Abweichung mit 22,4 u. 22,6 % schon auffällig größer.

Wenn die feuchtgewichtsbezogenen UDPGA-Gehalte bei Meerschw.-Leber um 23,8 % variieren, so streuen die entsprechenden Nierenwerte nur um 15,3 %. Für die auf DNA bezogenen UDPGA-Werte ist die Abweichung bei den Meerschw.-Lebern und Nieren etwa gleich (22,3 u. 23,6 %). Auch die auf Protein bezogenen UDPGA-Werte von Meerschw.-Lebern und Nieren streuen fast gleichstark, aber mit 31,8 u. 31,7 % wesentlich höher als die DNA- und FG-bezogenen Werte. Bei Rattenleber variieren die auf Feuchtgewicht bezogenen UDPGA-Werte am geringsten (14,5 %), gefolgt von den proteinbezogenen (17 %) und den DNA-bezogenen Werten (19,3 %).

Die auf das Homogenatvolumen bezogenen GT-Aktivitäten weichen bei Meerschw.-Leber um 15,4 % voneinander ab, bei den Nieren dagegen um fast das Doppelte (29,3 %). Durch den Bezug auf DNA oder Protein nähern sich die Streuungen der Leber- u. Nierenwerte aneinander an, DNA-bezogene 21,6 u. 22,1 % und proteinbezogene 23,8 u. 18,7 %. Durch die Einführung einer Bezugsgröße, die in einer zusätzlichen Untersuchung bestimmt werden muß, wird die Abweichung der GT-Aktivitätswerte bei Meerschw.-Leber also größer, bei den Nieren dagegen kleiner. Bei den Rattenlebern verhält es sich ähnlich, hier wird die Streuung der GT-Volumenaktivität (41,8 %!) durch den Bezug auf DNA (37,8 %) und Protein (33,3 %) kleiner.

Tab. 16: Vergleich der Streuung bei den verschiedenen Organanalysen. Wiedergegeben sind die in Prozent der Mittelwerte ausgedrückten Standardabweichungen (Variationskoeffizienten V.K.%).

	Meerschweinchen			Ratten	
	Leber	Nieren	Gehirn	Leber	Nieren
Gewicht	14,4	10,5	9,7	19,3	11,3
Protein	14,1	22,4	36,1	14,9	-
D N A	14,8	22,6	9,4	16,7	-
$\frac{\text{UDPGA}}{\text{FG}}$	23,8	15,3	0,6	14,5	-
$\frac{\text{UDPGA}}{\text{DNA}}$	22,3	23,6	10,0	19,3	-
$\frac{\text{UDPGA}}{\text{Prot.}}$	31,8	31,7	-	17,0	-
$\frac{\text{GT-Akt.}}{\text{Vol}}$	15,4	29,3	42,3	41,8	-
$\frac{\text{GT-Akt.}}{\text{DNA}}$	21,6	22,1	47,1	37,8	-
$\frac{\text{GT-Akt.}}{\text{Prot.}}$	23,8	18,7	106,7	33,3	-

Aus dem Vergleich der Variationskoeffizienten (Tab. 16) geht hervor, daß sich die einzelnen Werte nicht nur in bezug auf die Tierart sondern auch in bezug auf die verschiedenen Organe durchaus unterschiedlich verhalten. Nimmt man an, daß die Werte mit der kleinsten Streuung auch die Ergebnisse mit den geringsten Fehlern darstellen, so kann die Wahl der Bezugsgröße nicht zugunsten einer bestimmten Einheit ausfallen. Es fällt jedoch auf, daß bei DNA-bezogenen Werten die Organunterschiede in bezug auf die Standardabweichungen am kleinsten sind.

Weitere Gesichtspunkte zu der hier diskutierten Problematik können durch die Betrachtung der Korrelationen gewonnen werden; eine endgültige Klärung der Verhältnisse erscheint jedoch nur im Rahmen einer umfassenden Fehleranalyse möglich.

3. Korrelationen:

Sämtliche aus den Untersuchungen der Meerschweinchen resultierenden Daten wurden auf lineare Zusammenhänge je zweier Variablen geprüft. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist in der Korrelationskoeffizienten-Matrix (Abb. 22) zusammengefaßt. Darin sind alle Korrelationskoeffizienten, die sich signifikant von Null unterscheiden (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ ist mit * gekennzeichnet, $p < 0,01$ mit **) und einige auffällige Korrelationskoeffizienten, die nahe dem Schwellenwert des 5 % Niveaus liegen, wiedergegeben. Es ergeben sich einige primär evidente Gesetzmäßigkeiten, und einige Beziehungen sind interpretierbar. Andere Korrelationen wiederum erscheinen trotz geringer Irrtumswahrscheinlichkeit rein zufällig bedingt.

Die Betrachtung der Korrelationskoeff.-Matrix gibt im einzelnen Aufschluß über:

- a) das Verhältnis der einzelnen Bezugsgrößen zu den Enzym- bzw. Coenzymkonzentrationen der verschiedenen Gewebe.
- b) die Beziehungen zwischen den Werten eines Organs untereinander.
- c) die Beziehungen der Variablen zwischen Leber u. Nieren.

ad a):

Bei konstanten Enzymaktivitäten bzw. Coenzymgehalten müßte die Bezugsgröße, welche die biochemisch aktive Zellmasse am genauesten repräsentiert, auch am besten mit den Aktivitätseinheiten bzw. Cofaktormengen korrelieren. Ein solcher Zusammenhang ist wegen der großen individuellen Streuung der Werte schwer nachweisbar; lediglich bei den Meersch.-Nieren zeigt sich, daß der Proteingehalt der Homogenate am besten mit der auf Homogenatvolumen bezogenen GT-Aktivität korreliert ($r = 0,778$), gefolgt vom DNA-Gehalt, dessen positive Korrelation mit der Volumenaktivität weniger stark ausgeprägt ist ($r = 0,654$).

Daß die auf DNA und Protein bezogenen GT-Aktivitäten mit ihren Bezugsgrößen negativ korrelieren, erscheint primär evident, ist aber bezeichnenderweise nur für die Leber-Aktivitäten nachweisbar, nicht für die GT der Nieren.

ad b):

Was die Beziehungen der einzelnen Organwerte untereinander betrifft, so zeigen sich auch hier durchaus unterschiedliche Verhältnisse bei Leber und Nieren. Wenn die auf Feuchtgewicht und DNA bezogenen UDPGA-Werte der Leber sehr gut miteinander korrelieren ($r = 0,822$), so ist dieses bei den Nieren nur in geringerem Maße der Fall ($r = 0,635$). Ähnlich verhält es sich auch zwischen den DNA- und proteinbezogenen GT-Aktivitäten der Leber, die gut mit den Volumenaktivitäten korrelieren ($r = 0,745$ u. $0,848$), im Gegensatz zu den Werten der Nieren, wo nur die DNA-bezogene GT-Aktivität eine positive Korrelation mit der Volumenaktivität zeigt ($r = 0,711$). Möglicherweise werden diese Organunterschiede auch dadurch bedingt, daß bei der Leber kein Zusammenhang zwischen dem DNA- und dem Protein-Gehalt nachweisbar ist, wogegen diese Größen bei den Nieren in positiver Beziehung zueinander stehen ($r = 0,668$).

Ein primär vermuteter Zusammenhang zwischen der GT-Aktivität und dem UDPGA-Gehalt der einzelnen Organe konnte nicht nachgewiesen werden.

ad c):

Besonders eigenartige Beziehungen zeigen sich zwischen den Variablen der Leber und der Nieren. Die Korrelation des Lebergewichts mit dem Gewicht der Nieren ($r = 0,632$) ist dabei noch einleuchtend, schwer erklärbar ist dagegen der Zusammenhang zwischen dem Lebergewicht und dem auf Feuchtgewicht bezogenen UDPGA-Gehalt der Nieren ($r = 0,714$). Parallel dazu zeigt das Nierengewicht eine negative Beziehung zum UDPGA-Gehalt der Leber ($r = -0,621$). Besonders auffällig und primär nicht einzusehen ist die negative Korrelation zwischen der Volumenaktivität der Nieren-GT und dem UDPGA-Gehalt der Leber, bezogen auf Feuchtgewicht ($r = -0,701$) sowie auf DNA ($r = -0,632$). Ebenso verhält sich der auf DNA bezogene UDPGA-Gehalt der Nieren negativ zu der Volumenaktivität der Leber-GT und zu den DNA-bezogenen GT-Aktivitäten der Leber.

Um diese Beziehungen besser durchschaubar zu machen, wurden einige Transformationen gebildet. Dabei erschien es am sinnvollsten, das Produkt von Enzymaktivität und Cofaktorgehalt der Leber mit dem entsprechenden Produkt der Nierenwerte zu korrelieren. Hier spielen die Bezugsgrößen nun eine ausschlaggebende Rolle. Bezieht man das Produkt GT-Aktivität mal UDPGA-Gehalt auf Protein, so läßt sich kein linearer Zusammenhang zwischen Leber und Nieren nachweisen ($r = -0,438$), auf Homogenatvolumen bezogene Werte ergeben schon einen höheren Korrelationskoeffizienten ($r = -0,629$) und für die Enzym-Cofaktor-Produkte, in die der DNA-Gehalt als Bezugsgröße eingeht, läßt sich eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen Leber und Nieren auch statistisch absichern. ($r = -0,712$ / $p < 0,05$) (Abb. 23).

Betrachtet man das Produkt aus UDPGA und GT-Aktivität als ein Maß für die Biotransformationskapazität der einzelnen Organe, so ergibt sich aus der hier nachgewiesenen Korrelation, daß die Nieren gegenüber der Leber eine kompensierende oder nachgeschaltete Funktion im Entgiftungsgeschehen des Organismus ausfüllen, speziell was den Weg über die Glucuronidierung auszuscheidender Substanzen betrifft.

MS-Leber

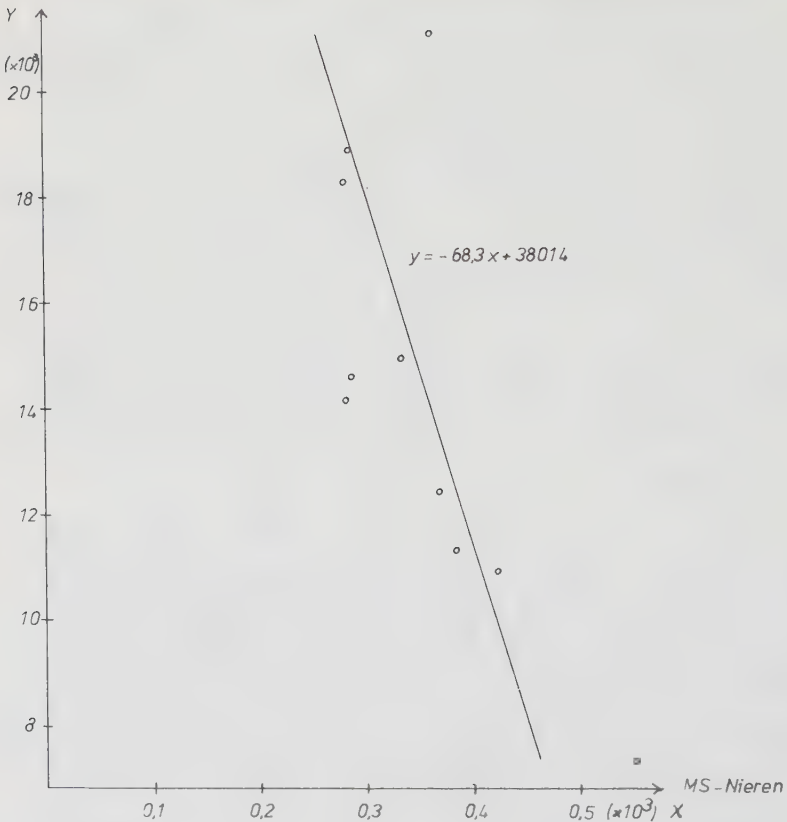


Abb. 23: Korrelation der Enzym-Cofaktor-Produkte zwischen Leber und Nieren bei Meerschweinchen.

$$\text{Produkt: } \frac{\mu\text{Mol UDPGA}}{100\text{g FC}} \times \frac{\text{mU GT-Akt.}}{\text{mg DNA}}$$

Korrelationskoeffizient: $r = -0,712$

Prüfquotient: $t = -2,874$ bei $n = 8$

Wahrscheinlichkeitsgrad: $p < 0,05$

Ein ähnlicher Kompensationsmechanismus wurde bereits in früheren Untersuchungen vermutet (22, 25), als sich bei Meerschweinchen nach experimenteller Hepatopathie durch Thioacetamidbehandlung eine Aktivitätssteigerung der Äthertransferasen in den Nieren bei signifikant erniedrigter Leberaktivität abzeichnete. Dabei mußte im Gegensatz zu den hier untersuchten Normaltieren jedoch auch eine Enzyminduktion durch das injizierte Thioacetamid als Ursache angenommen werden, wie sie bereits für andere an der Entgiftung beteiligte Enzyme nachgewiesen wurde (56, 57).

Inwieweit die an den Meerschweinchen erhobenen Befunde auf den menschlichen Organismus übertragbar sind, ist fraglich; Meerschweinchen werden jedoch bei derartigen Stoffwechseluntersuchungen oft deshalb als Versuchstiere gewählt, weil der Glucuronsäurestoffwechsel des Meerschweinchens mit seinem Unvermögen, aus Glucuronsäure Ascorbinsäure zu produzieren, dem des Menschen sehr ähnlich ist (55).

Zusammenfassung

1. Eine enzymatische Methode zur quantitativen Bestimmung von Uridindiphosphatglucuronsäure in wäßrigen Lösungen und in biologischem Material wird beschrieben, die es auf Grund der Optimierung der einzelnen Reaktionsbedingungen ermöglicht, kleinste UDPGA-Mengen ohne vorherige Isolation der Nucleotide zu messen.

Zur Organanalyse eignen sich gekochte Gewebsextrakte, zu deren Herstellung ein einfaches Verfahren mitgeteilt wird.

Die Brauchbarkeit sowie die Grenzen der Methode werden durch Wiederfindungsversuche demonstriert. Es können 0,5 - 20 μg UDPGA bestimmt werden mit einer Empfindlichkeit von 0,8 μg UDPGA/ml. In Doppelversuchen ist die Präzision der Methode besser als 5 %.

2. Uridindiphosphatglucuronsäure-Konzentrationen und Glucuronyltransferase-Aktivitäten von Organen normaler Meerschweinchen und Ratten werden mitgeteilt und Vergleiche mit bisher bekannten Werten und anderen Bestimmungsverfahren angestellt.

Verschiedene Bezugsgrößen bei den Organanalysen, unterschiedliche Streuungen und Korrelationen bei Meerschweinchen werden diskutiert.

3. "Aktivierte Glucuronsäure" kann mit der hier ausgearbeiteten Methode in menschlichem Untersuchungsmaterial wie Vollblut, Serum und Urin von gesunden und von leberkranken Personen nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis.

- 1) ARIAS, I.M.: Gilbert's disease. Bull. N.Y. Acad. Med. 35, 450-461 (1959).
- 2) ARIAS, I.M.: The chemical basis of kernikterus. Adv. clin. Chem. 3, 35-82 (1960).
- 3) AXELROD, J. und J.K. INSCOE u. G.M. TOMKINS: Enzymatic synthesis of N-glucosyluronic acid conjugates. J. Biol. Chem. 232, 835-841 (1958).
- 4) BECK, K., E. RICHTER und B. KIANI: Paarung mit Glucuronsäure und Bilirubinelimination am Beispiel der anikterischen Lebercirrhose. Dtsch. med. Wschr. 90, 1005-1008 (1965).
- 5) BERGMAYER H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., I.u.II.Bd., Weinheim/Bergstr. 1970.
- 6) BRATTON, A.C. und E.K. MARSHALL: A new coupling component for sulfanilamid determination. J. biol. Chem. 128, 537-550 (1939).
- 7) BUSCH, E.-W., I.-M. v. BORCKE, H. GREVE und W. THORN: Quantitative Bestimmung von RNA- und DNA-Gehalten in Säugetierorganen. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 801-808 (1968).
- 8) COTTE, J., M. MATHIEU, J.P. ANDRE, C. COLLOMBEL und L. PADIS: Méthode de dosage de l'activité glucuronyl-transferase hépatique applicable en biologie clinique. Enzym. biol. clin. 8, 387-399 (1967).
- 9) DAVIDSON, J.N.: The biochemistry of the nucleic acids. London - New York 1961.
- 10) DUTTON, G.J.: The isolation of a compound of uridine diphosphat and glucuronic acid from liver. Biochem. J. 53, XXXVII - XXXVIII (1953).
- 11) DUTTON, G.J.: UDPGA as a glucuronyl donor in the synthesis of ester, aliphatic and steroid glucuronides. Biochem. J. 64, 693-701 (1956).

- 12) DUTTON, G.J.: Glucuronide synthesis in foetal liver and other tissues. *Biochem. J.* 71, 141-148, (1959)
- 13) DUTTON G.J.: The biosynthesis of glucuronides. In: G. J. DUTTON (Hrsg.): *Glucuronic acid. Free and combined*. S. 185-299, New York - London 1966.
- 14) DUTTON, G.J. und I.D.E. STOREY: Uridine compounds in glucuronic acid metabolism. I. The formation of glucuronides in liver suspensions. *Biochem. J.* 57, 275-283 (1954).
- 15) DUTTON, G.J. und I.D.E. STOREY: Uridine compounds in glucuronic acid metabolism. II. The isolation and structure of 'uridine-diphosphat-glucuronic acid'. *Biochem. J.* 59, 279-288 (1955).
- 16) DUTTON, G.J. und I.D.E. STOREY: Glucuronide-forming enzymes. $\text{UDPglucuronic acid} + \text{R:OH} \rightarrow \text{UDP} + \text{R.O.}-\text{glucuronic acid}$. In: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN (Hrsg.): *Methods in enzymologie*. Vol. V. S. 159-164. New York 1962.
- 17) Enzyme Nomenclature. In: FLORKIN, M. und E.H. STOTZ: *Comprehensive biochemistry*. Vol. 13. New York 1965.
- 18) FISHMAN, W.H.: Determination of β -glucuronidases. *Methods of biochemical analysis*. Vol. 15. S. 77-145. New York 1967.
- 19) FREI, J., E. SCHMID und H. BIRCHMEIER: UDP-glucuronyl-Transferase. In: BERGMAYER, H.U. (Hrsg.): *Methoden der enzymatischen Analyse*, 2. Aufl., I.Bd., S. 679-684. Weinheim/Bergstr. 1970.
- 20) FREZZA, M., G. de SANDRE, G. PERONA und R. CORROCHER: Bilirubin inhibition of 4-methylumbelliferone glucuro conjugation in vitro bei the human liver. *Clin. chim. Acta* 21, 509-512 (1968).
- 21) FÖRSTER, H. und H. MEHNERT: Kohlenhydratstoffwechsel. In: SIEGENTHALER, W. (Hrsg.): *Klinische Pathophysiologie*, 2. Aufl., S. 34-92. Stuttgart 1973.

- 22) GEMPP-FRIEDRICH, W.: Untersuchungen der Glucuronyltransferasen beim Meerschweinchen nach Langzeitbehandlung mit Thioacetamid. Dissertationsschrift, Mainz 1970.
- 23) GRAM, Th.E., A.R. HANSEN und J.R. FOUTS: The submicrosomal distribution of hepatic uridine diphosphate glucuronyltransferase in the rabbit. *Biochem. J.* 106, 587-591 (1968).
- 24) GRODSKY, G.M. und J.V. CARBONE: The synthesis of bilirubin glucuronide by tissue homogenates. *J. biol. Chem.* 226, 449-458 (1957).
- 25) HAMMAR, C.-H.: Glucuronyltransferase bei Leberkrankheiten und experimenteller Leberschädigung. Habilitationsschrift, Mainz 1969.
- 26) HAMMAR, C.-H. und W. GEMPP-FRIEDRICH: Glucuronyltransferasen des Meerschweinchens bei experimenteller Hepatopathie infolge Langzeitbehandlung mit Thioacetamid. *Res. exp. Med.* 160, 112-121 (1973).
- 27) HAMMAR, C.-H. und W. PRELLWITZ: Untersuchungen über die Glucuronyltransferase bei Meerschweinchen nach Behandlung mit Thioacetamid. *Enzym. biol. clin.* 8, 203-208 (1967).
- 28) HELDT, H.W.: Phosphathaltige Metabolite in Anionenaustauscherchromatogrammen säurelöslicher Extrakte aus Rattenleber im Nanobereich. *Biochem. Z.* 337, 397-413 (1955).
- 29) HEMINGWAY, A., J. PRYDE und R.T. WILLIAMS: XX. The biochemistry and physiology of glucuronic acid. V. The site and mechanism of the formation of conjugated glucuronic acid. *Biochem. J.* 28, 136-142 (1934).
- 30) HESS, R. und A. PEARSE: Histochemical demonstration of uridine diphosphate glucose dehydrogenase. *Experientia* 17, 317-318 (1961).
- 31) HOWLAND, R.D., A. BURKHALTER, A.J. TREVOR, S. HECEMAN und D.Y. SHIRACHI: Properties of lubrol-extracted uridine diphosphate glucuronyltransferase. *Biochem. J.* 125, 991-997 (1971).

- 32) HURLBERT, R.B. und V.R. POTTER: Nucleotide metabolism. I. The conversion of orotic acid-6-C¹⁴ to uridine nucleotides. J. biol. Chem. 209, 1-21 (1954).
- 33) ISSELBACHER, K.J.: Enzymatic mechanisms of hormone metabolism. II. Mechanism of hormonal glucuronide formation. Recent Progress in Hormone Research XII, 134-146 (1956).
- 34) ISSELBACHER, K.J.: Enzymatic formation of corticosteroid glucuronides. J. Amer. chem. Soc. 77,1, 1070-1071 (1955).
- 35) ISSELBACHER, K.J., M.F. CHRABAS und R.C. QUINN: The solubilization and partial purification of a glucuronyl transferase from rabbit liver microsomes. J. biol. Chem. 237, 3033-3036 (1962).
- 36) KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 6. Aufl., S. 266, Stuttgart 1967.
- 37) KAWADA, M.: The quantitative determination of uridine diphosphoglucuronic acid. J. Biochem. 49, 78-79 (1961).
- 38) KISSANE, J.M. und E. ROBINS: The fluorometric measurement of desoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. J. biol. Chem. 233, 184-188 (1958).
- 39) LATHE, G.H. und M. WALKER: The synthesis of bilirubin glucuronide in animal and human liver. Biochem. J. 70, 705-712 (1958).
- 40) LESLIE, I.: In: E. CHARGAFF und J.N. DAVIDSON (Hrsg.): The nucleic acids. S. 1-50, New York 1955.
- 41) LEVENTER, L.L., J.L. BUCHANAN, J.E. ROSS und D.F. TAPLEY: Solubilization of N-glucuronyl transferase. Biochim. biophys. Acta 110, 428-430 (1965).
- 42) LEVY, G.A. und I.D.E. STOREY: Measurement of glucuronide synthesis by tissue preparations. Biochem. J. 44, 295-299 (1949).
- 43) LIPSCHITZ, W.L. und E. BUEDING: Mechanism of biological

formation of conjugated glucuronic acids.

J. biol. Chem. 129, 333-358 (1939).

- 44) MATTHEY, M.: Beitrag zur Leberfunktionsprüfung durch Antifebrinbelastung. Schweiz. med. Wschr. 94, 41-46 (1964).
- 45) METGE, W.R., C.A. OWEN, W.T. FOULK und H.N. HOFFMAN: Bilirubin glucuronyl transferase activity in liver disease. J. Lab. clin. Med. 64, 89-98 (1964).
- 46) MIETTINEN, T.A. und E. LESKINEN: Enzyme levels of glucuronic acid metabolism in normal and fasted rats. Biochem. Pharmacol. 12, 565-575 (1963).
- 47) MILIS, G.T. und E.B. SMITH: Uridin nucleotide compounds of liver. Biochim. biophys. Acta 13, 386-400 (1954).
- 48) MILLS, G.T. und E.B. SMITH: In: H.U. BERGMAYER (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. 1. Aufl. S. 581-595. Weinheim/Bergstr. 1962.
- 49) MULDER, G.J.: The heterogeneity of uridine diphosphat glucuronyltransferase from rat liver. Biochem. J. 125, 9-15 (1971).
- 50) MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B., A. HASSELBLATT und R. JAHN: Vermehrte Bildung von Bilirubinglucuronid in der Leber während der Insulin- und Sulfonylharnstoff-Hypoglykämie. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. 260, 254-268 (1968).
- 51) MÜTING, D.: Die Entgiftungsleistung der Leber bei Leberkrankheiten. Dtsch. med. Wschr. 88, 130-134 (1963).
- 52) PERONA, G., M. FREZZA, C. DALLA ROSA und G. DE SANDRE: Transglucuronidase activity of the liver: a dosage method suitable for fragments obtained with needle biopsy. Clin Chim. Acta 10, 513-520 (1964).
- 53) POGELL, B.M. und L.F. LELOIR: Nucleotide activation of liver microsomal glucuronidation. J. biol. Chem. 236, 293-298 (1961).
- 54) PRELLWITZ, W.: Der Einfluß von Hormonen auf den Eisen- und Kupferhaushalt. Habilitationsschrift. Mainz 1965.

- 55) PRELLWITZ, W., C.-H. HAMMAR und J. DUDECK: Haptoglobin und Caeruloplasmin bei Krankheiten der Leber und der Gallenwege. Dtsch. med. Wschr. 93, 1277-1281 (1968).
- 56) REMMER, H.: Die Elimination von Arzneimitteln durch enzymatischen Abbau in der Leber. Internist 7, 413-418 (1966).
- 57) REMMER, H. und A. HILDEBRANDT: Zur Induzierbarkeit bei der Glucuronidsynthese beteiligter Enzyme. In: K. BECK (Hrsg.): Ikterus, S. 19-27, Stuttgart - New York 1968.
- 58) RICHTERICH, R.: Klinische Chemie. 2. Aufl., S. 245-247, Akad. Verlagsges. Frankfurt a.M. 1968.
- 59) SCHMID, R., L. HAMMAKER und J. AXELROD: The enzymatic formation of bilirubin glucuronide. Arch. Biochem. 70, 285-288 (1957).
- 60) SCHNEIDER, W.C. und G.H. HOGEBOOM: Intrazellulär distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrom c in rat liver homogenates. J. biol. Chem. 183, 123-128 (1950).
- 61) SMITH, R.L. und R.T. WILLIAMS: Implication of the conjugation of drugs and other exogenous compounds. In: G.J. DUTTON (Hrsg.): Glucuronic acid. Free and combined. S. 457-491. New York - London 1966.
- 62) STEVENSON, I.H. und G.J. DUTTON: Glucuronide synthesis in kidney and gastrointestinal tract. Biochem. J. 82, 330-340 (1962).
- 63) STROMINGER, J.L., E.S. MAXWELL, J. AXELROD und H.M. KALCKAR: Enzymatic formation of uridinediphosphoglucuronic acid. J. biol. Chem. 224, 79-90 (1957).
- 64) STOREY, I.D.E.: Some differences in the conjugation of o-aminophenol and p-nitrophenol by the uridine diphosphate transglucuronylase of mouse-liver homogenates. Biochem. J. 95, 209-214 (1965).

- 65) TAKETA, K.: Enzymatic studies of glucuronide formation in impaired liver. I. Assay methods for the determination of glucuronyl transferase activity and uridine diphosphate glucuronic acid content of liver tissue using 4-methyl umbelliferone as a glucuronide receptor; its application to needle liver biopsy tissues. *Acta Med. Okayama* 16, 71-89 (1962).
- 66) TOMLINSON, G.A. and S.J. Yaffe: The formation of bilirubin and p-nitrophenyl glucuronides by rat liver. *Biochem. J.* 99, 507-512 (1966).
- 67) TSUBOI, K.K. und PRICE, T.D.: Isolation, detection and measure of microgram quantities of labeled tissue nucleotides. *Archs. Biochem. Biophys.* 81, 223-237 (1959).
- 68) VAN ROY, F.P. und K.P.M. HEIRWEGH: Determination of bilirubin glucuronide and assay of glucuronyltransferase with bilirubin as acceptor. *Biochem. J.* 107, 507-518 (1968).
- 69) VEST, M.F. und E. FRITZ: Studies on the disturbance of glucuronide formation in infectious hepatitis. *J. clin. Path.* 14, 482-487 (1961).
- 70) WEIL-MALHERBE, H.: In: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: *Handbuch der physiologisch-und pathologisch-chemischen Analyse*. III. Bd. 1. Teil, S. 526. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.
- 71) WILKE, H. und H. SPIELMANN: Untersuchungen über den Magnesiumgehalt der Leber bei der Cirrhose. *Klin. Wschr.* 46, 1162-1164 (1968).
- 72) WONG, K.P.: Bilirubin glucuronyltransferase. Specific assay and kinetic studies. *Biochem. J.* 125, 27-35 (1971).
- 73) ZHIVKOV, V.: Measurement of uridine diphosphate glucuronic acid concentrations and synthesis in animal tissues. *Biochem. J.* 120, 505-508 (1970).

Lebenslauf

Am 10. Januar 1948 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Kurt Schmitt und seiner Ehefrau Johanna, geborene Brouwers, in Lorsch, Kreis Bergstraße, in Hessen geboren. Ich bin katholisch getauft und besitze wie meine Eltern die deutsche Staatsangehörigkeit.

Nach vier Jahren Grundschule in Lorsch besuchte ich ab Ostern 1958 das Starkenburg-Gymnasium in Heppenheim, Kreis Bergstraße, zuletzt im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig und legte hier im November 1966 die Reifeprüfung ab.

Im April 1967 erfolgte meine Immatrikulation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz zunächst in die Naturwissenschaftliche Fakultät. Mit der Umschreibung im Wintersemester 1967/68 war ich zum Studium der Zahnheilkunde zugelassen. In Mainz studierte ich zehn Semester und bestand am 15. März 1968 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 6. Oktober 1969 die zahnärztliche Vorprüfung und am 3. Juli 1972 die zahnärztliche Prüfung.

Nach meinem Staatsexamen war ich in der väterlichen Praxis in Lorsch als Assistent tätig. Nach Erhalt meines Dissertationsthemas war ich ab Januar 1973 im Zentrallabor der Medizinischen Universitätskliniken (Leiter: Prof. Dr. med. W. Prellwitz) in Mainz mit der Durchführung der Experimente für die vorliegende Arbeit beschäftigt. Die Zeit nach Abschluß der Versuche im April 1974 diente zur endgültigen Fertigstellung der Doktorarbeit.

